

**REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE**

**MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR  
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE**

**Centre Universitaire Salhi Ahmed Naâma**



**Institut des Sciences et Technologies  
Département des Sciences de la Nature et de la Vie**

## **MÉMOIRE**

Présenté en vue de l'obtention du Diplôme de

**Master Académique en Sciences biologiques  
Spécialité « Microbiologie Appliquée »**

Thème

# **Evaluation de la vie bactérienne dans la sebkha de Naâma**

Par :

**BOUBEKEUR Halima**

**BOUCHETA Rania**

Soutenu le : 13 Juillet 2019

Devant le jury :

Président :	<b>Mr. NOURI Tayeb</b>	M.C.B
Encadrant :	<b>Mr. SEDDIKI Sidi Mohammed Lahbib</b>	M.C.A
Examineurs :	<b>Mr. AMROUCHE Abdelilah</b>	M.C.A
	<b>Mr. GHERIB Mohammed</b>	M.C.A

**Année Universitaire : 2018 / 2019**

# Remerciements

*Avant tout, nous remercions Allah le tout puissant de nous avoir donné le privilège, la chance d'étudier et de nous avoir donné force, courage et patience pour accomplir ce travail.*

*En premier lieu nous tenons à exprimer nos plus vifs remerciements à Monsieur Seddiki Sidi Mohammed Lahbib, du Département des Sciences de la Nature et de la Vie de nous avoir encadré, orienté, aidé et conseillé et qui fut pour nous un directeur de mémoire attentif et disponible. Sa compétence, sa rigueur scientifique et sa clairvoyance nous a beaucoup appris. Qu'il trouve en ces mots toute notre gratitude.*

*Nous remercions Monsieur Nouri Fayeh, Département des Sciences de la Nature et de la Vie, Centre Universitaire Salhi Ahmed de Naâma, pour ses conseils et d'avoir accepté la présidence de jury de ce mémoire.*

*Nos vifs remerciements vont également aux membres du jury :*  
*Mr Amrouche Abdelillah, Directeur adjoint du centre universitaire de Naâma,*  
*Mr Gherib Mohammed, Directeur adjoint de l'Institut des sciences et technologie, centre universitaire de Naâma.*

*Pour l'intérêt qu'ils ont porté à notre recherche en acceptant d'examiner notre travail et de l'enrichir par leurs propositions. Veuillez trouver ici l'expression de nos remerciements distingués.*

*Nos remerciements s'adressent aussi à tous les professeurs qui nous ont enseigné et qui par leurs compétences nous ont soutenu dans la poursuite de nos études, et qui par leurs paroles, leurs écrits, leurs*

*conseils et leurs critiques ont guidé nos réflexions et ont accepté à nos  
rencontrer et répondre à nos questions durant les recherches.*

*Nous tenons à remercier aussi le personnel des laboratoires pédagogiques  
pour leurs soutient pendant cette période.*

*Nos remerciements vont également à tous notre amis, qui nous ont soutenu  
moralement le long de ce travail et particulièrement Zahra, Rajaa, Israe,  
Salima, Khiera, Hayat, Fatima, Sabah, Fatiha, ... qui ont su créer une  
ambiance chaleureuse de camaraderie et de travail qui restera un souvenir  
que nous conserve de cette période.*

*Nous exprimons nos vifs remerciements à tous ceux qui nous ont aidés de  
près ou de loin, et encouragé pour la réalisation de ce mémoire, qu'ils  
trouvent ici l'expression de nos remerciements les plus sincères.*

# Dédicace

*Je dédie ce mémoire à...*

Mes très chers parents, qui ont toujours été là pour moi, vous avez tout sacrifié pour vos enfants n'épargnant ni santé ni efforts. Vous m'avez donné un magnifique modèle de labeur et de persévérance. Je suis redevable d'une éducation dont je suis fier.

## ***A ma chère mère***

Affable, honorable, aimable. Tu représentes pour moi le symbole de la bonté par excellence, la source de tendresse et l'exemple du dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi. Que Dieu te donne longue vie et te protège pour moi.

## ***A mon cher père***

Tes conseils m'ont suivi et m'ont permis d'atteindre le bout du chemin. Sois fier de moi aujourd'hui et vois à travers ce travail mon amour sincère et ma gratitude profonde.

Que Dieu te donne longue vie et te protège.

## ***A mes très chères sœurs***

SANAA et CHAIMAA elles représentent pour moi le symbole de courage et la source de tendresse.

Je remercie mes frères ABDOU et NASRO, pour leur encouragement qui ont toujours été là pour moi.

***A tous mes proches et mes amis.***

*Rania*

# Dédicace

*Du profond de mon cœur, je dédie ce travail à tous ceux qui sont chers*

## ***A ma chère mère***

Aucune dédicace ne saurait exprime mon amour éternel, et mon respect 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. Puisse dieu ; le très haute, vous accorder santé, bonheur et longue vie.

## ***A mon cher père***

Ce travail est dédié à mon père, qui a su se montrer patient, compréhensif et encourageant, et toujours poussé et motivé dans mes études. Que dieu vous procure santé, prospérité et bonheur.

A mes sœurs *NOR EL HOUDA* et *CHAHRAZED*, et mes frères *BACHIR* et *SID AHMED*, les prunelles de mes yeux, que dieu vous garde et vous protège que votre chemin soit plein succès.

## ***A toutes ma famille***

## ***Ames chères amies***

Pour leurs aides et supports dans les moments difficiles

***A tous ceux que j'aime et ceux qui m'aiment.***

*Halima*

# Liste d'abréviation

%	Pourcentage
pH	Potentiel hydrogène
CE	Conductivité électrique
NaCl	Chlorure de sodium
K <sup>+</sup>	Ion de potassium
Mg <sup>2+</sup>	Ion de magnésium
HCO <sub>3</sub>	Ion bicarbonate
CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	Ion carbonate
Cl <sup>-</sup>	Chlore
Ca <sup>2+</sup>	Ion de calcium
UFC	unité formant colonies

# Liste des figures

<b>Figure 1.</b> Biofilm mature de <i>Staphylococcus aureus</i> visualisées par microscopie électronique à balayage.....	12
<b>Figure 2.</b> Situation géographique de la Sebka de Naâma .....	16
<b>Figure 3.</b> Situation géographique de la wilaya de Naâma et la zone d'étude.....	20
<b>Figure 4.</b> Coordonnées GPS correspondantes aux sites des prélèvements.....	29
<b>Figure 5.</b> Organigramme des étapes de révélation de la formation des biofilms.....	36
<b>Figure 6.</b> Faunes et flores observés dans la sebka de Naâma.....	39
<b>Figure 7.</b> Diagramme de dénombrement d'UFC.....	42
<b>Figure 8.</b> Aspect macroscopique des colonies.....	45
<b>Figure 9.</b> Observation microscopique après la coloration de Gram.....	46
<b>Figure 10.</b> Hydrolyse de l'esculine.....	48
<b>Figure 11.</b> Tolérances des souches isolées aux différentes concentrations de NaCl.....	50
<b>Figure 12.</b> Révélation de l'intensité de la couleur Cristal violet dans les puits des microplaques.....	53

# Liste des tableaux

<b>Tableau 1.</b> Classification des microorganismes selon leur croissance à différentes concentrations en NaCl.....	8
<b>Tableau 2.</b> Moyennes des précipitation mensuelles et annuelles de la station de Naâma pour la période.....	24
<b>Tableau3.</b> Moyenne des précipitations mensuelles de la station de Naâma .....	22
<b>Tableau 4.</b> Indice de Martonne de la zone.....	25
<b>Tableau 5.</b> Résultats des analyses physico-chimiques du sol de la sebkha de Naâma.....	40
<b>Tableau 6.</b> Résultats de l'aspect macroscopique/microscopique des souches.....	44
<b>Tableau 7.</b> Potentiel de former les biofilms chez les souches isolées.....	54

# Table des matières

Remerciements .....	ii
Dédicace .....	iv
Dédicace .....	v
Liste d'abréviation .....	vi
Liste des figures .....	vii
Liste des tableaux .....	viii
Table des matières .....	ix
Première partie : synthèses bibliographiques	
Chapitre I : Les microorganismes extrêmophiles .....	6
Chapitre II: les sebkhas et salinité du sol .....	13
2. Généralités sur les sebkhas .....	14
2.1. Définition des sebkhas .....	14
2.2. Classification selon le bilan hydrologique .....	14
2.3. Classification selon leur formation.....	15
2.3. Salinité de sol.....	17
2.3.1. Effet de la salinité sur le sol.....	18
Chapitre III. Présentation de la zone d' études .....	19
Deuxième partie: Matériels et méthodes	
1.1 Prélèvements.....	26
1.2 Analyses physico-chimiques de sol.....	27
1.2.1 pH.....	27
1.2.2 Humidité.....	27
1.2.3 Conductivité électrique (CE).....	28

1.2.4	Taux de carbone total .....	28
1.3	Analyses microbiologiques .....	28
1.3.1	Isolement, purification et conservation des souches isolées .....	28
1.3.2	Identification des isolats .....	29
1.3.3	Caractères biochimiques .....	29
1.3.4	Évaluation des caractères extrêmophiles des isolats .....	31
1.3.5	Évaluation de la formation des biofilms .....	32
<b>Troisième partie: Résultats et discussion</b>		
1.4	Prélèvements .....	35
1.5	Analyses physico-chimiques de sol .....	36
1.6	Analyses microbiologiques .....	39
1.6.1	Isolement, purification et conservation .....	39
1.6.2	Identifications des isolats .....	40
1.6.3	Caractères biochimiques .....	44
1.6.4	Évaluation des caractères extrêmophiles des isolats .....	45
1.6.5	Évaluation de la formation des biofilms .....	50
<b>Conclusion.....</b>		<b>56</b>
<b>Références bibliographiques.....</b>		<b>57</b>
<b>AnnexeI .composition de la gélose et du bouillon nutritif.....</b>		<b>65</b>
<b>Annexe II. Tests d'identification des isolats.....</b>		<b>63</b>
<b>ملخص.....</b>		<b>67</b>
<b>Abstract.....</b>		<b>64</b>
<b>Résumé.....</b>		<b>64</b>

# *Introduction générale*

**D**ans la nature, les microorganismes de par leur spécificité, leurs propriétés uniques et leur grande diversité métabolique sont innombrables et abondent différents types d'habitats. Cela inclut des habitats tels que le sol, l'eau, l'air.

Jusqu'au 20<sup>ème</sup> siècle, on pensait que la vie n'était possible que dans un environnement normal qui présente des conditions compatibles avec la vie de l'homme, puis, les chercheurs ont commencé à découvrir que certains environnements extrêmes tels que les régions volcaniques, les océans polaires, les lacs salés, les sources hydrothermales, la calotte glaciaire de l'Antarctique et les milieux alcalins ou acides qui s'avèrent trop rigoureux pour le développement d'une vie sont colonisés par certains microorganismes en dépassant toutes les limites physicochimiques de la vie. C'est le cas de **Thomas Brock** qui, dans les années 60, a trouvé une espèce thermophile importante dans l'avancement de la biologie moléculaire : *Thermus aquaticus*. Cette espèce a été découverte dans les sources thermales du Parc de Yellowstone aux États-Unis, c'est une source de la célèbre enzyme *Taq polymérase*, utilisée pour l'élongation des brins d'ADN à haute température au cours de la *Polymerase Chain Reaction* (PCR) (**Podar et Reysenbach, 2006**).

Ces dernières années, la recherche sur la biodiversité microbienne des environnements hyper salins 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**).

Cet intérêt croissant pour les microorganismes halophiles et halotolérants est dû au désir de connaître les limites possibles de la vie mais aussi d'élargir les connaissances dans le domaine de la vie dans ces milieux extrêmes, de la biodiversité et de la physiologie adaptative particulière de ces microorganismes.

L'objectif de ce présent travail est vu l'importance des sebkhas dans l'évolution de l'écosystème, ainsi que celui des bactéries halophiles / halotolérantes dans le maintien de la biodiversité et l'évolution du cycle géochimique, nous nous sommes intéressés à l'étude de la vie bactérienne dans le sol de la sebkha de Naâma. De ce fait, nous nous sommes fixés les objectifs suivants :

- La première partie de notre travail est consacrée à la description des données bibliographiques relatives à sebkha qui est un environnement hyper salin et aux microorganismes halophiles.
- La deuxième partie, se focalisera sur les différentes techniques utilisées qui ont été mises en œuvre pour étudier le sol de la sebkha et la diversité microbienne et donc de caractériser les souches isolées.
- Les résultats obtenus avec ces différentes méthodes sont discutés dans la troisième partie.
- Enfin la dernière partie rassemblera la conclusion finale et dégagera les perspectives de recherche.

*Synthèse*  
*bibliographique*

*Chapitre I*

*Les Microorganismes*

*extrêmophiles*

### 1. Les microorganismes extrêmophiles

Les microorganismes omniprésents dans notre environnement et dans quelques aliments que nous consommons, ne cessent d'occuper une place de plus en plus importante dans notre vie.

La croissance et la survie des microorganismes sont contrôlées par plusieurs facteurs physico-chimiques, biotiques et abiotiques. Cela signifie qu'un biotope, pour un microorganisme, est déterminé par une gamme pour chaque facteur permettant la croissance **(Kristjansson et Hreggvidsson, 1995)**.

La découverte à la fin des années 1930 que la vie pourrait exister dans des environnements aussi extrêmes. Le terme « *extrêmophiles* » a été inventé pour la première fois, en 1974, par **MacELROY**, dans un journal intitulé '*Some comments on the evolution of extremophiles*', il a été interprété par plusieurs façons pour enfin être associé aux microorganismes qui peuplent des niches écologiques extrêmes caractérisées par des conditions défavorables pour le développement d'une vie **(Irwin et Baird, 2004)**.

Les scientifiques ont été très intéressés à en apprendre davantage sur les caractéristiques et les processus de ces « *extrêmophiles* » qui leur permettent de vivre dans ces milieux hostiles. Ces dernières années, la recherche sur la biodiversité microbienne des environnements hyper salins s'est multipliée. En effet, les études visant une compréhension approfondie de ces environnements et des microorganismes appartenant à ces écosystèmes comme le Grand lac salé, Utah (USA), la Mer Morte et les marais salants de plusieurs pays comme le Lac Rose au Sénégal, les sebkhas au Nord de l'Afrique etc..., ont abouti à la découverte de nouveaux genres et espèces bactériennes **(D'Alessandro et al., 2006)**.

Les premiers microorganismes extrêmophiles isolés font partie des halophiles découverts dans un environnement qu'on croyait dépourvu de vie, d'où son nom : *la mer morte*. Ils vivent dans des concentrations en sels très élevée.

### 1.2. Diversité des milieux extrêmes

Les microorganismes extrêmophiles peuvent être répertoriés en plusieurs groupes, selon leurs paramètres de croissance et les conditions dans lesquelles ils existent (hautes et basse températures, valeurs extrêmes de pH, hautes concentrations de sel, hautes pressions et radiations)

#### 1.2.1. Les microorganismes halotolérants et halophiles

De nombreuses définitions ont été données dans la littérature pour qualifier les termes **halophile** et **halotolérant**. Elles sont basées sur la réponse de la croissance des microorganismes en présence de chlorure de sodium (NaCl). Il est toutefois très difficile d'établir des limites qui définissent l'halophilisme et l'halotolérance car de nombreux facteurs comme la température, la concentration et la présence de certains nutriments, et où la présence d'autres sels, modifient considérablement la réponse des bactéries à NaCl (**Kharroub et al., 2007**).

Le mot halophile est composé de deux parties « *hals* » qui veut dire le sel et « *phil* » qui veut dire aime de ce fait les microorganismes halophiles sont définis comme étant des organismes qui requièrent du sel pour leur croissance (**Ebel et al., 2004**).

Les êtres halophiles sont un groupe d'organismes qui vivent dans les environnements hyper salins et exigent dans beaucoup de cas la salinité pour survivre. Ce groupe inclue une grande diversité d'organismes, comme les bactéries aérobies modérément halophiles, les cyanobactéries, les bactéries sulfo-oxydantes, les bactéries hétérotrophes, les bactéries anaérobies, les *archaea*, les protozoaires, les mycètes, les algues et les eucaryotes multicellulaires (**DasSarma et al., 2002**). Qui sont divisés en :

- Ceux qui sont capables de se développer sans sel tout en tolérant des concentrations élevées en sel, ce sont les microorganismes halotolérants (**Echigo et al., 2005**).
- Ceux qui ne se développent qu'en présence de sel, ce sont les microorganismes halophiles (**Tiquia et al., 2007**).

Les microorganismes nécessitant moins de 2% (p /v) de sel pour une croissance optimale ne sont pas considérés comme halophiles (Ollivier et al., 1994).

Selon la classification de Larsen (1962), quatre groupes des bactéries halophiles sont répertoriés (Tableau1). Cependant, Yoon et al., (2003) ont caractérisés ces bactéries d'halotolérantes puisqu'elles sont capables de se développer sans sel tout en tolérant des différentes concentrations en NaCl.

**Tableau 1.** Classification des microorganismes selon leur croissance à différentes concentrations en NaCl (Larsen, 1962).

Classification de Larsen (1962)	
Catégories	[NaCl] %
Non –halophiles	< 2
Halophiles légères	2 à 5
Halophiles modérées	5 à 20
Halophiles extrêmes	>20

Sur le plan taxonomique, les microorganismes halophiles et halotolérants sont répandus dans un grand nombre de groupes phylogénétiques, ils appartiennent aux phylums *Spirochaetes*, *Proteobacteria*, *Cyanobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroides* et *Firmicutes* (De Vos et al., 2009).

Les membres du phylum *Firmicutes* sont hautement divers aux niveaux morphologique et physiologique et sont capables d'habiter une grande variété d'environnements, tels que les sont pas considérés comme halophiles (Ollivier et al., 1994).

Les membres du phylum *Firmicutes* sont hautement divers aux niveaux morphologique et physiologique et sont capables d'habiter une grande variété d'environnements, tels que les habitats hyper salin (**Aslim et al., 2002**). La famille des *Bacillaceae*, appartenant à ce phylum est la plus importante avec 21 genres incluant des espèces halophiles (**Akel et al., 2008**).

A l'exception des membres de *Bacillus cereus* qui possède des extrémités carrées, le genre *Bacillus* représente un groupe hétérogène de bactéries en forme de bâtonnets droit ou légèrement incurvées. Ces bactéries Gram positif ont des extrémités arrondies et sont d'une longueur de 0.9 à 10 µm. Ce groupe de bactérie est immobile, aérobie ou anaérobie facultatif, sauf pour certaines espèces qui peuvent être anaérobies strictes. Les espèces de *Bacillus* sont capables de former des endospores résistantes aux variations de température, aux radiations, à la désinfection et à la dessiccation (**De Vos et al., 2009**).

De plus, les microorganismes du genre *Bacillus* sont omniprésents dans la nature, leur principal habitat est le sol. Les espèces de ce genre possèdent une diversité physiologique et métabolique importante et des capacités qui leur permettent de survivre dans des habitats extrêmes (**Amoozegar et al., 2009**).

La propriété des microorganismes halotolérants à s'adapter rapidement aux changements des concentrations externes de sel, les rend meilleurs candidats pour la bio-prospection que leurs homologues halophiles qui dépendent strictement de la présence de sel (**Shivanand et Jayaraman, 2009**).

Dans le groupe de microorganismes halotolérants, il existe plusieurs catégories (**Tiquia et al., 2007**)

- Les microorganismes légèrement halotolérants qui tolèrent des concentrations de NaCl de 6 à 8% (p/v).
- Les halotolérants modérés qui tolèrent des concentrations de NaCl jusqu'à 18 à 20% (p/v).
- Les halotolérants extrêmes qui tolèrent toutes concentrations de NaCl varient de 0%.

Concernant les halophiles, nombreuses définitions ont été données par différents auteurs, en fonction de leur nécessité en sel (NaCl) pour une croissance optimale.

### 1.2.2 Les microorganismes extrêmophiles et la température

Certains extrêmophiles existent dans des écosystèmes où la température atteint des valeurs maximales tels que les fumeurs noirs et les sources hydrothermales (**Irwin et Baird, 2004**), ou des valeurs minimales comme les mers froides polaires, les glaciers alpins et les sédiments océaniques (**Cavicchioli et al., 2002**).

Ces extrêmophiles sont classés en :

➤ **Thermophiles**

qui se développent d'une manière optimale aux alentours de 60°C (**Nakagawa et al., 2004**).

➤ **Hyperthermophiles**

Sont des thermophiles extrêmes qui présentent des optimums de croissance à des températures comprises entre 80 et 110°C (**Madigan et Martino, 2006**).

Les microorganismes hyperthermophiles peuvent être des anaérobies, des aérobies chimio litho-autotrophes ou hétérotrophes.

➤ **Psychrophiles :**

Se développent de façon optimale à des températures inférieures ou égales à 15 °C avec un maximum de croissance à 20°C, et sont incapables de croître au-dessus de 20 ° C (**Irwin et Baird, 2004**).

Les habitats des microorganismes psychrophiles comprennent où les ressources nutritives ne sont présentes qu'en faible quantité et où la température descend parfois à des niveaux incroyablement bas, et les eaux glacières (**Vincent et al., 2004**) qui ne sont pas seulement caractérisées par des basses températures, mais aussi par une pression élevée (**Cavicchioli et al., 2002**).

### ➤ **Psychrotrophes**

Sont capables de se développer à des températures inférieures ou égales à 15°C, mais, leur croissance optimale est atteinte à des températures égales ou supérieures à 18°C (Irwin et Baird, 2004).

### **1.2.3. Microorganismes alcalophiles et acidophiles**

#### **1.2.3.1. Microorganismes acidophiles**

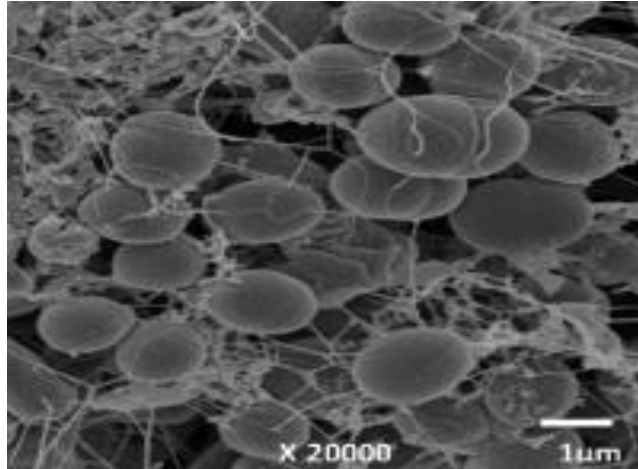
Les microorganismes acidophiles se développent de façon optimale à un pH égal à 2 (Morozkina et al., 2010), ils colonisent des environnements acides alors que les acido-tolérants peuvent être isolés à partir des environnements à pH neutre (Horikoshi., 1999).

Les environnements où sont retrouvés les micro-organismes acidophiles ont généralement un pH<4.

#### **1.2.3.2. Les micro-organismes alcalophiles**

Les alcalophiles sont des microorganismes qui se développent de façon optimale à pH supérieur à 9,0, souvent avec un pH optimum autour de 10,0, tout en montrant la croissance peu ou pas près des valeurs de pH neutres (Horikoshi., 1999).

Il existe différentes stratégies, permettant aux bactéries de survivre et de résister aux conditions extrêmes de l'environnement. Parmi celles-ci, les biofilms qui sont des amas structurés de cellules bactériennes adhérents à une surface et enrobés d'une matrice exopolymérique/autoproduite, composée de polysaccharides, de protéines, d'acides nucléiques et d'autres composés organiques et inorganiques (Figure 2). Le développement des biofilms survient en réponse à des signaux extracellulaires, soit présents dans l'environnement ou produits par les cellules bactériennes. Cette structure a un rôle de protection des bactéries contre la dessiccation, les agents antimicrobiens ainsi que d'autres agressions externes (Stanley et al., 2004).



**Figure 1.** Biofilm mature de *Staphylococcus aureus* visualisées par microscopie électronique à balayage (**Rebiahi et al., 2014**)

La capacité de former un biofilm est maintenant reconnue comme une caractéristique propre à plusieurs microorganismes. On estime d'ailleurs que 80 % de la biomasse microbienne de notre planète réside sous forme d'un biofilm (**Donlan et al., 2002**).

# *Chapitre II*

## *Les selkhas et Salinité des sals*

### 2. Généralités sur les sebkhas

#### 2.1. Définition de la sebkha

Sebkha, en arabe, mot qui désigne les plaines salines soumises à des inondations périodiques. Dans les milieux désertiques, les dépressions ne sont occupées que temporairement par de l'eau. Une forte évaporation conduit à la formation caractéristique d'une croûte d'évaporites qui tapissent le fond de ces dépressions.

Une sebkha désigne un bassin occupant le fond d'une dépression à forte salinité plus ou moins séparé d'un milieu marin, dans des régions arides. Néanmoins, il peut être toujours en contact par un très faible filet d'eau (bassin d'eau profond), ou au contraire par des infiltrations (bassin d'eau peu profond) dans ce cas il peut se produire des débordements périodiques d'eau vers le bassin. Dans les deux cas il va y avoir une augmentation de la salinité, une évaporation importante, l'apparition d'une saumure et la précipitation d'évaporites au fond du bassin si la profondeur est faible, ou à une extrémité si la profondeur est importante. Ils se sont surtout situés au Nord de l'Afrique et dans le Moyen Orient (**Gouga, 2014**).

#### 2.2. Classification des Sebkhas

##### 2.2.1. Classification selon le bilan hydrologique

L'étude qui faite par (**Yan, 2001**) a classé les lacs salés en trois (3) types, selon leurs bilans hydrologiques à savoir :

##### A. Les lacs éphémères de type (A)

Ce sont des lacs saisonniers, pouvant devenir secs dans un intervalle de temps très court, cela est dû au taux d'évaporation très élevé. Il s'agit de bassins fermés et ne reçoivent pratiquement pas de la matière minérale dissoute. Le PH dans ce cas est contrôlé par la réaction des minéraux seulement, parce que les protons libérés par les réactions de ces derniers ne peuvent pas être neutralisés par le flux des bicarbonates. La basse alcalinité des eaux rend le milieu acide.

##### B. Les lacs éternels, de longue durée, de type (B)

Le volume d'eau dans ce type de lac décroît graduellement dans un grand intervalle de temps. En contre partie, la salinité du lac décroît à cause du flux d'eau qui arrive au lac,

provoquant la dilution des eaux donc le PH du lac est souvent maintenu pendant longtemps à un niveau élevé.

### C. Les lacs éternels à très grande durée, de type (C)

Leur volume d'eau reste constant pendant de très longues périodes. L'augmentation de la salinité est continue dans le temps à cause du flux de la matière dissoute, déversée dans le lac. Le PH reste élevé et dépend de la minérale dissoute.

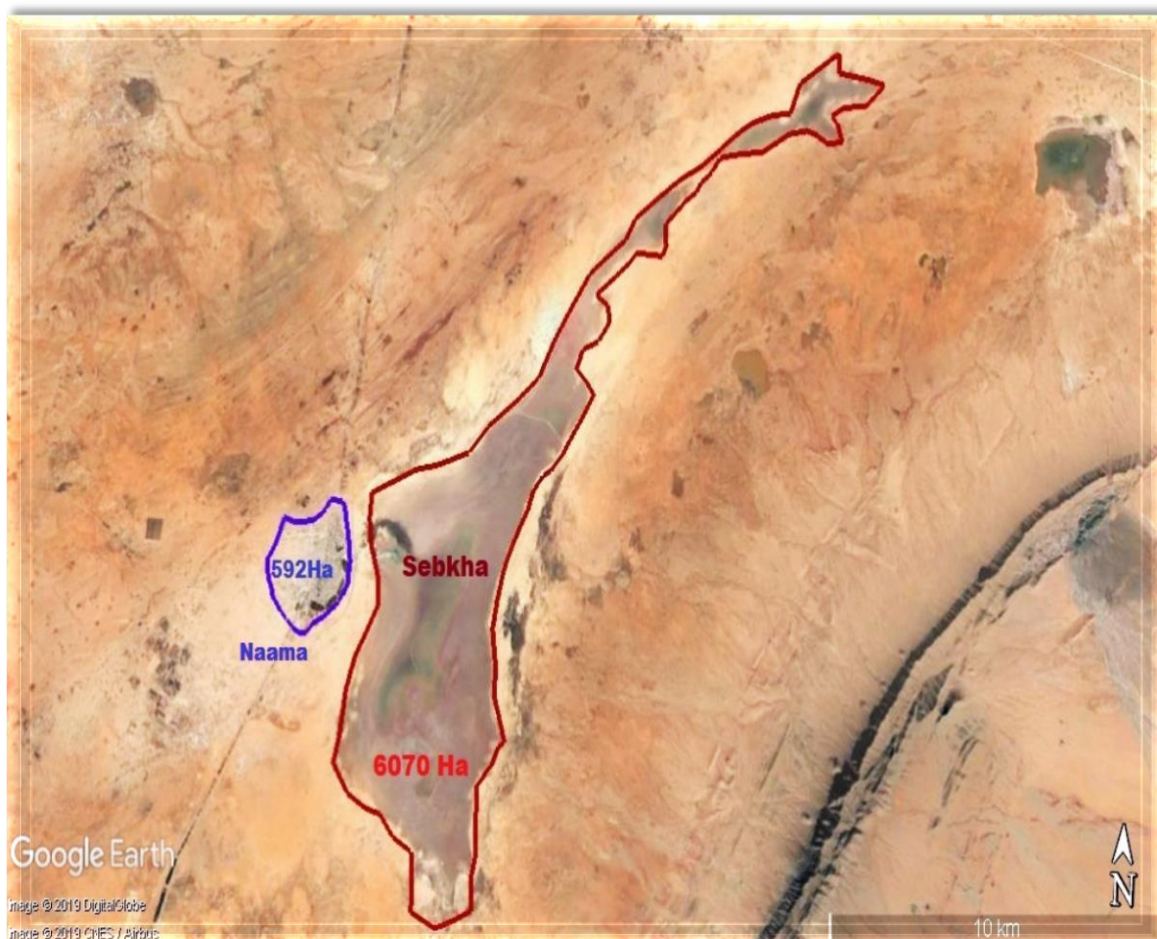
#### 2.2.2. Classification selon le milieu de formation

Les Sebkhas sont des écosystèmes naturels. Elles sont des centres de dépressions fermées et salées. Leur formation est contrôlée en grande partie par les changements temporels des précipitations à l'intérieur du bassin, la température et l'évaporation jouent un rôle dans leur développement (**Demnati, 2013**). Cependant, ces biotopes contribuent à la protection de la biodiversité en assurant plusieurs fonctions telles que la vie aquatique, les cycles géochimiques et hydrologiques (**Gouga, 2014**).

Les différents types de sebkha dépendent de leur milieu de formation. Mais toutes les sebkhas ont un point commun : il s'agit de zone proche de la nappe phréatique. La déflation joue jusqu'à ce que soit atteint le niveau hydrostatique, par capillarité l'eau de la nappe subit une aspiration due à sa propre évaporation en surface. Se faisant, elle dépose successivement des sels dissous de carbonate de calcium ( $\text{CaCO}_3$ ) de gypse ( $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) d'anhydrite ( $\text{CaSO}_4$ ) et de chlorure de sodium ( $\text{NaCl}$ ) qui précipitent pour donner une croûte imperméable et parfois très épaisse d'évaporites (**Boutelli, 2012**).

L'Algérie, le plus grand pays de l'Afrique, compte de nombreux écosystèmes hyper salins. En effet, 3,2 millions d'hectares de sa surface sont salins (**Barbouchi et al., 2013**). Les milieux hyper salins sont nombreux au Algérie, plusieurs d'entre eux sont considérés comme zones humides et certains classés site Ramsar. De nombreuses études ont porté sur ces milieux mettant en avant leur diversité faunistique et floristique. Cependant, l'étude des milieux hyper salins algérienne de point de vue diversité microbienne a été négligée. La sebkha de Naâma en fait partie, c'est une bande allongée, située entre l'Atlas tellien et l'Atlas saharien dans sa partie occidentale à une altitude de 1160 m. Elle se localise entre  $32^\circ 08'45''$

Sud et 34°22'13" de latitude Nord et 0°36'45" Est à 0°46'05" de longitude Ouest. Par ailleurs, la sebkha de Naâma occupe une superficie de 6070 hectares, soit 11 fois supérieur à celle de la ville de Naâma (**Figure 2**).



**Figure 2.** Situation géographique de la Sebkha de Naâma (**Google earth, mai 2019**).

Dans manière générale, la Sebkha est un environnement extrême et une dépression relativement plate, tantôt ennoyée, tantôt asséchée, généralement assez proche du littoral et présentant une couche de sel en surface (Michel 2016). C'est un environnement 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. Ces paramètres se résument en un pH inférieur à 5 ou supérieur à 9, une pression supérieure à 20 MPa, une température supérieure à 50°C ou inférieure à 10°C et des concentrations en NaCl Supérieures à 4 % (Grégoire et al., 2009).

## 2.3. Salinité de sol

Le sol est un environnement où cohabitent les racines des végétaux, les animaux et les microorganismes, c'est un assemblage complexe de substances minérales et organiques, de gaz et d'eau, à l'intérieur duquel se déroulent simultanément des phénomènes de dégradation et de synthèse.

Le phénomène de salinisation de sol est un processus d'accumulation des sels minéraux solubles, constitués d'un mélange de cations ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ...) et d'anions ( $\text{Cl}^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ;  $\text{CO}_3^{2-}$ ;  $\text{HCO}_3^-$ ). Ceux-ci provoquent une dégradation des propriétés biologiques, chimiques et physiques des sols qui diminue leurs fertilités et entraîne une réduction des rendements des cultures et parfois la disparition de la couverture végétale naturelle (**Alexandratos, 2010** ; **Saidi et al., 2004**). Elle peut être causée soit par des processus naturels qui sont touchés beaucoup plus les sols en particulier dans les régions arides et semi-arides (**Munns, 2009**), il y a des **salinisations primaire**, ou être induite par des activités humaines, **salinisation secondaire**.

Le premier est le résultat d'une accumulation progressive des ions nécessaires à la formation des sels solubles et la seconde est le résultat d'accumulation des sels apportés par l'eau supplémentaire induite par des activités humaines (**Ghassemi et al., 1995**).

Selon la **Kaurichev (1980)** ; les sols contenant une concentration en sels soluble supérieure à 0,2 % (p/v), sont considérés comme salins. Ils sont fréquents en régions arides et de nombreuses plantes halophytes se sont adaptées à de telles conditions. Et sa conductivité électrique (CE) est supérieure à 4 (dS/m), cette valeur correspond à 2,4 g/L de Na Cl (**Baize, 2016** ; **Hillel, 2005** ; **Tanji, 2002**).

### 2.3.1. Effets de la salinité sur le sol

#### 2.3.1.1. Sur la structure du sol

La structure du sol peut être définie comme le regroupement de particules primaires du sol dans les agrégats ; qui donne une importance sur son fonctionnement (**Lavelle et Spain, 2001**). L'augmentation de la quantité de sodium dans un sol entraîne la destruction de sa

structure. Un excès de sodium favorise la dispersion des colloïdes minéraux et par conséquent la réduction de la structure poreuse du sol.

En effet, la salinisation augmente ainsi l'imperméabilité des couches profondes du sol ce qui empêche l'aération et la pénétration de l'eau nécessaire pour une croissance normale des plantes (**Ghassemi et al., 1995**).

### **2.3.1.2. Sur les bactéries du sol**

Dans leur habitat naturel, les micro-organismes sont fréquemment exposés à des variations de pression osmotique du milieu environnant. En effet, la salinité élevée du sol peut interférer avec la croissance et l'activité des bactéries. Les bactéries halophiles sont adaptées à la vie dans un environnement hyper salé qui ont développé des mécanismes d'adaptation leur permettant de disposer d'une machinerie cellulaire capable de supporter de fortes concentrations intracellulaires de sel, principalement du KCl (**Oren, 1999**).

# *Chapitre III*

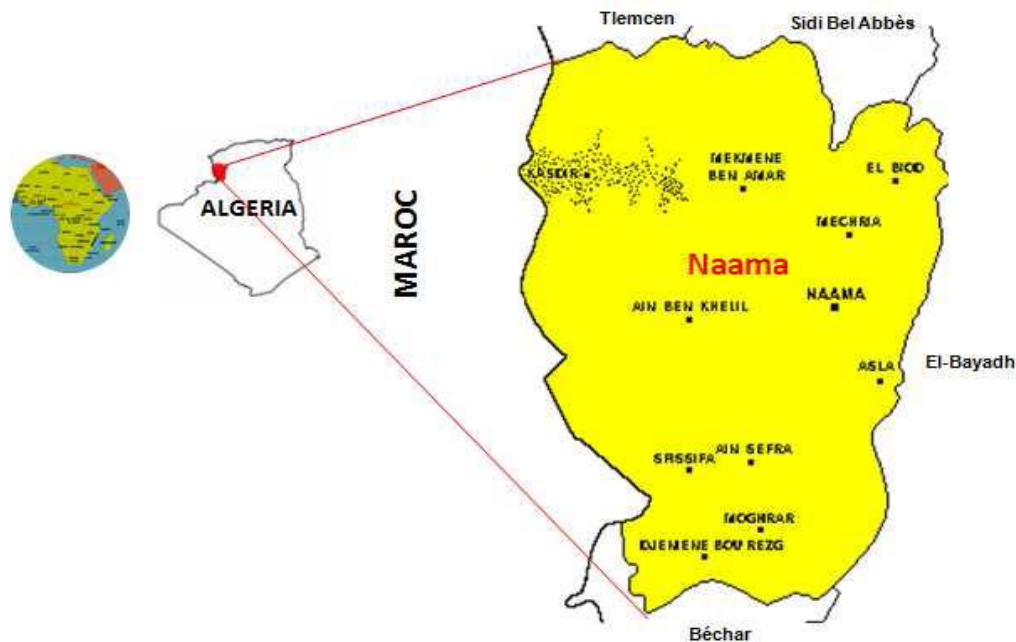
## *Présentation de la zone d'étude*

### 1. Situation géographique

La wilaya de Naâma, La wilaya de Naâma est issue du dernier découpage administratif de 1984. Elle se compose de 7 daïras regroupant 12 communes.

La wilaya de Naâma fait partie des hautes plaines sud –oranaises, elle se localise entre  $32^{\circ} 08'45''$  et  $34^{\circ}22'13''$  de latitude nord, et de  $0^{\circ}36'45''$  est à  $0^{\circ}46'05''$  de longitude ouest. Elle est située entre l'Atlas tellien et l'Atlas saharien dans sa partie occidentale (Fig.3). Elle est limitée au nord par les wilayas de Tlemcen et de Sidi Bel Abbès, à l'est par la wilaya d'El- Bayadh, au sud par la wilaya de Béchar et à l'ouest par la frontière Algéro-Marocaine le royaume du Maroc par une bande frontalière longue de 275 Km.

Elle s'étend sur un vaste territoire (29.514,10 km<sup>2</sup> de superficie) à climat de plus en plus aride. Elle est occupée par une population est localisé le long de l'axe routier Oran — Béchar sur un espace de plus de un million d'Ha soit 37 % de la superficie totale, ce qui traduit une mauvaise occupation de l'espace et dispose d'un grand ensemble d'écosystèmes et de diversité biologique.



**Figure3.** Situation géographique de la wilaya de Naâma et la zone d'étude (D.P.S.B. Naâma ,2013).

**Une zone steppique** constituée par une vaste plaine (74% du territoire de la wilaya) dont l'altitude augmente sensiblement vers le sud (1000 à 1300 m). Elle est caractérisée par la prédominance de l'activité pastorale. D'ouest à l'est, elle couvre l'espace compris entre les reliefs proches de la frontière Algéro-Marocaine et la limite occidentale de la wilaya d'El Bayadh. Dans cet espace la majeure partie des eaux de ruissellement sont drainées vers les deux endoréismes que constitue la zone, il s'agit du Chott Rharbi (1317 km<sup>2</sup>) à l'ouest et du Chott Chergui à l'est (12216 km<sup>2</sup>). **(Bensaid, 2006).**

**Une zone montagneuse** localisée dans la région sud-ouest atteignant les 2000 mètres d'altitude et occupant 12 % du territoire de la wilaya. Il s'agit d'une partie des monts des Ksour et des piémonts de l'Atlas Saharien. Elle est caractérisée par une agriculture de type oasien **(Bensaid,2006).**

**Une zone présaharienne** qui s'étend sur une superficie de l'ordre de 14% de la superficie totale de la wilaya.

### **2. Types de climat de la zone**

Pour les données climatiques, nous nous sommes référés à la station météorologique de Naâma pour une durée de 23 ans (1995 à 2018).

#### **2.1. Précipitations**

D'après le **tableau 2** on observe que les valeurs des moyennes mensuelles de la pluviométrie indiquent une sécheresse importante durant le mois Juillet, contrairement dans le mois le plus humide est Octobre avec 29,1 mm.

**Tableau 2.** Moyennes des précipitations mensuelles et annuelles de la station de Naâma en (mm) pour la période (1995 – 2018).

Date	Janvier	Février	Mars	Avril	Mai	Juin	Juillet	Aout	Septembre	Octobre	Novembre	Décembre
Pluie (mm)	11,7	12,9	17,5	16,4	14,9	13,5	3,8	13,3	18,3	29,1	26,1	12,2

**Tableau 3.** Moyenne des précipitations mensuelles, en (mm), de l'année 2018 de la station de Naâma en(mm).

Date	Janvier	Février	Mars	Avril	Mai	Juin	Juillet	Aout	Septembre	Octobre	Novembre	Décembre
Pluie (mm)	8,1	18,0	26,4	37,8	14,5	0,0	0,0	121,4	13,7	67,8	39,4	2,0

### 2.2. Gelées

La wilaya de Naâma à l'instar des espaces Hauts plateaux, subit des gelées importantes et fréquentes en hiver et même au début du printemps. Leur fréquence est évaluée en moyenne de 40 jours pour la (Station de Naâma).

Les gelées constituent un facteur limitant pour les pratiques agricoles et un facteur de contrainte pour la végétation naturelle (**Mahmoudi ,2014**).

### 3. Classification du climat

#### 3.1. Indice d'aridité de Martonne

**Martonne (1923)** a défini un indice d'aridité utile pour évaluer l'intensité de la sécheresse exprimée par la relation suivante :

$$I = \frac{P}{T + 1}$$

**P** : précipitations totales annuelles en mm.

**T** : température moyenne annuelle en C °.

**I < 5** : Climat hyper arides

**5 < I < 7,5** : Climat désertique

**7,5 < I < 10**: Climat steppique

**10 < I < 20**: Climat semi arides

**10 < I < 20**: Climat tempéré

La station Naâma est sous interférence d'un climat désertique.

**Tableau 4.** Indice de Martonne de la zone d'étude.

Station	P (mm)	T(C°)	I	Type de climat
Naâma	189.89 mm	18.21	6.73	Climat désertique

#### 4. Types des sols

On peut distinguer plusieurs types des sols

##### 4.1. Sols calcimagnésiques

Elle est représentée par plusieurs types de sols : les rendzines, sols bruns calcaires et sols bruns calciques, sols à encroûtement gypseux. Ces sols occupent les glacis du quaternaire ancien et moyen (**Bensaid, 2006**).

##### 4.2. Sols minéraux bruts

Les sols minéraux bruts sont représentés par les sols minéraux bruts d'érosion, les sols minéraux bruts d'apport alluvial et les sols minéraux bruts d'apport éolien.

##### -Sols minéraux bruts d'érosion

Sont situés sur de fortes pentes où les couches superficielles sont constamment entraînées empêchant ainsi la formation du sol. Le couvert végétal est très peu significatif avec toutefois quelques reliques de chêne vert (*Quercus ilex*) et le genévrier oxycèdre (*Juniperus oxycedrus*) (**Bensaid, 2006**).

##### -Sols minéraux bruts d'apport alluvial

Se rencontrent au niveau des oueds importants. Ils présentent une texture sableuse, une forte charge caillouteuse et leur profondeur est variable.

### **-Sols minéraux bruts d'apport éolien**

Ils sont constitués de sable et de dunes plus au moins mobiles. Ces sols sont occupés par une végétation psammophile à *Aristida pungens* et *Arthrophytum scoparium* (**Bensaid, 2006**).

### **4.3. Sols peu évolués**

La classe de sols peu évolués est composée par :

- Les sols peu évolués d'érosion sur roche mère dure (calcaire et gré) ou tendre (marnes), présentant une proportion élevée d'éléments grossiers, une forte charge caillouteuse et un faible taux de matière organique (<2%).
- Les sols peu évolués d'apport alluvial occupent particulièrement les zones basses (zone d'épandage, daïa, chenaux d'oued). Ces sols représentent la majeure partie des terres mises en culture.

### **4.4. Sols halomorphes**

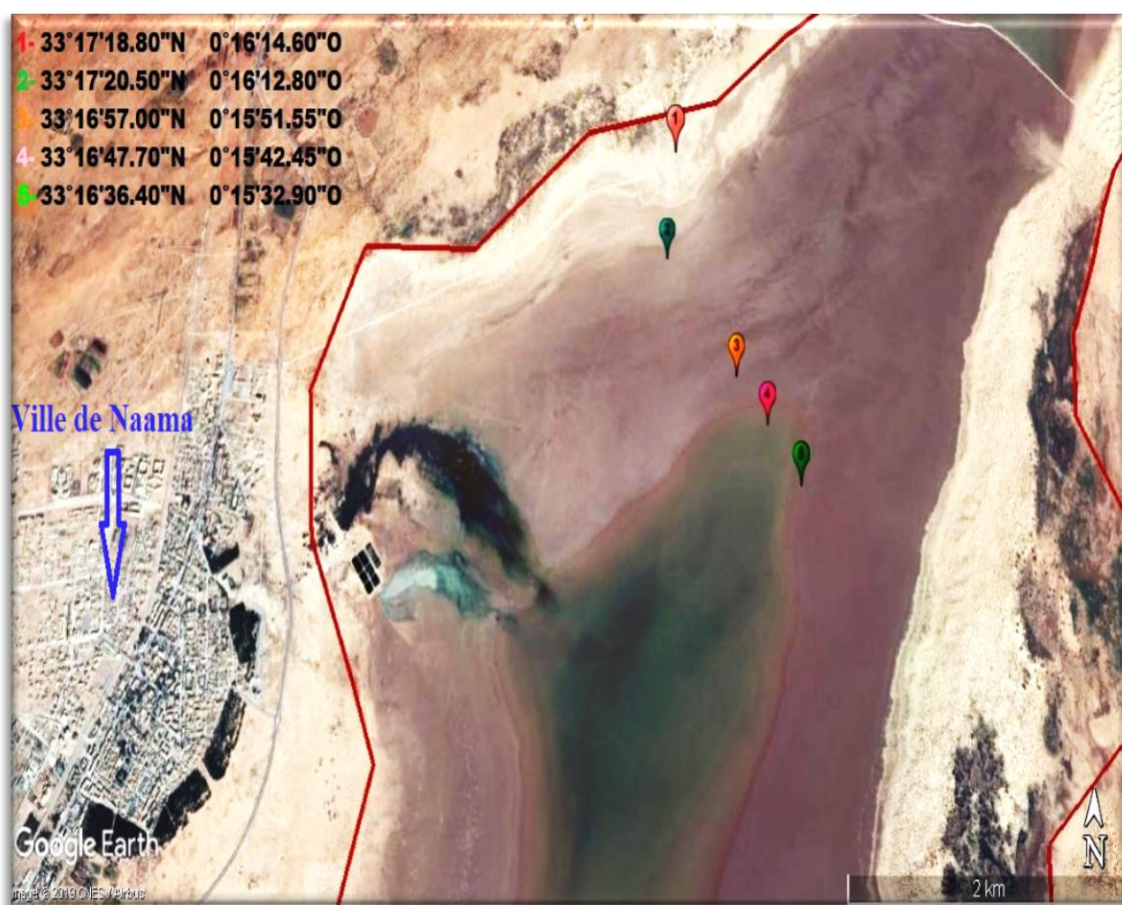
Ils se localisent au niveau des zones de dépressions (Chott et sebkha) et des zones d'épandage des principaux oueds. Ces sols se développent sur des matériaux alluviaux à texture sablo limoneuse, et ils se répartissent en auréoles autour des chotts et des sebkhas et en bas des glacis. Leur couvert végétal bien qu'homogène dans l'ensemble varie selon leur degré de salinité et leur taux d'humidité. Quand la salure est trop importante, la végétation se compose d'espèces hyper-halophytes (*Halcnemum strobilaceum*). Toutefois, lorsque cette salure diminue on rencontre un couvert végétal halophyte qui se compose de *Salsola vermiculata*, *Attriplex halimus* et *Suaedafruticosa* (**Bensaid, 2006**).

# *Matériels et méthodes*

Le présent travail est réalisé au laboratoire de microbiologie, centre universitaire de Naâma.

### 1.1 Prélèvements

Les échantillons de sol sont prélevés de cinq sites différents de la Sebka de Naâma en février 2019. Ceux-ci sont réalisés suivant une ligne droite, allant de la périphérie vers le centre de la sebka. Les coordonnées GPS des endroits de prélèvements sont prisent à l'aide d'un appareil GPS (GARMIN, GPS72H), déterminent les sites de prélèvement (figure6).



**Figure 4.** Coordonnées GPS correspondantes aux sites des prélèvements (Google earth, 2019).

Les prélèvements de sol sont effectués selon les recommandations de Afnor (2005). Après avoir écarté la couche superficielle du sol, environ deux centimètres d'épaisseurs, les prélèvements des échantillons sont réalisés par une tarière manuelle. Celle-ci est enfoncée dans le sol en la tournant dans le sens des aiguilles d'une montre afin d'obtenir une "carotte" complète. Deux prélèvements sont réalisés du même site, le premier à la profondeur de 15 cm alors que le deuxième à 30cm. Le sol prélevé est mis ensuite dans des sachets stériles en plastique qui sont ramenés au laboratoire pour analyse.

### 1.2 Analyses physico-chimiques de sol

Les paramètres physico-chimiques de sol suivants sont réalisés ; pH, humidité, Conductivité électrique et taux de carbonetotal.

Avant de passer aux différentes analyses, les échantillons du sol sont mis à sécher à l'air libre pendant 7 jours. La terre est ensuite tamisée par un tamis aux mailles de 2mm pour séparer les gros éléments de la terre fine (Afnor, 2005).

#### 1.2.1 pH

Dix grammes de sol sont homogénéisés dans 25 mL d'eau distillée. Après agitation à l'aide d'un homogénéisateur pendant 15 minutes, la solution est laissée à décanter 5 minutes puis filtrée. La mesure de pH est effectuée ensuite à l'aide d'un pH mètre (Adwa AD1030).

#### 1.2.2 Humidité

Le taux d'humidité d'un sol détermine les caractéristiques de diffusion ou de stockage de l'eau dans ce sol.

Selon Lee et Hwang (2002), la mesure de l'humidité du sol de la sebkha est effectuée par le prélèvement de dix grammes qui sont mis à 105°C pendant 2 jours, ce qui correspond à l'obtention d'un poids constant.

Le taux d'humidité est calculé d'après la formule suivante :

$$H\% = \frac{PH-PS}{PH} \times 100$$

H : Humidité en pourcentage

PH : poids humide de l'échantillon

PS : poidssec de l'échantillon

### **1.2.3 Conductivité électrique (CE)**

La conductivité électrique permet de déterminer la salinité d'un sol. Selon la norme ISO : 11265, le filtrat du sol dilué au 1/5 (p/v) dans l'eau distillée est préparé.

Celui-ci est agité pendant 30minutes puis mis à décanter. La conductivité électrique est mesurée grâce à un conductivimètre (Sens IONTM+MM150, HACH). Les résultats sont exprimés en (*ms/cm*).

### **1.2.4 Taux de carbone total**

Le taux de carbone total de sol est constitué pour l'essentiel de la transformation des résidus végétaux, animaux et des corps microbiens, ainsi que de carbone issue du solcomme le calcaire.

Cinq grammes de terre fine sont mis dans un creuset en silice. Celui-ci est placé dans l'étuve à 105° Celsius pendant 24 heures. L'échantillon est ensuite pesé puis mis dans un four à moufle à 700°C pendant une heure et demi.

En tenant en compte la masse de la terre avant et après passage à haute température, le taux de carbone peut être calculé (**Baiez et Jabiol, 1995**).

## **1.3 Analyses microbiologiques**

### **1.3.1 Isolement, purification et conservation des souches isolées**

Un gramme de sol est ajouté à 9mL d'eau physiologique stérile, puis agité au vortex et décanté. Une série des dilutions ( $10^{-1}$  à  $10^{-3}$ ) est réalisée à partir du surnageant.

La gélose nutritive (**Annexe I**), préalablement coulée en boîte de Pétri, est ensuite inondée par les suspensions préparées pendant 20minutes. Le surplus est éliminé et les

boîtes de Pétri sont incubées à 30°C jusqu'à 48 heures après avoir mis à sécher. Toutes les expériences sont réalisées en duplicata.

Un dénombrement des colonies est effectué par la suite par l'utilisation de compteur des colonies. Les résultats des dénombrements sont exprimés en moyennes  $\pm$ SE.

Les colonies à différents aspects macroscopiques sont sélectionnées, purifiées par repiquage successifs sur bouillon et gélose nutritive et sont ensuite conservées à 4°C sur gélose inclinée en tubes (**Roger et Garcia, 2001**).

### **1.3.2 Identification des isolats**

#### **a) Aspect macroscopique**

L'aspect macroscopique des colonies des souches isolées est déterminé après ensemencement et incubation à 30°C sur gélose nutritive.

Les colonies sont différenciées et sélectionnée selon leurs tailles, couleur, formes, contour....

#### **b) Aspect microscopique**

Afin de vérifier la mobilité, un état frais est réalisé en utilisant un microscope optique aux grossissements respectifs  $\times 400$  et  $\times 1000$  (**Harley et Prescott, 2002**). Une coloration de Gram est effectuée pour déterminer le type de paroi bactérienne, la forme, la présence ou absence de spores, le mode de regroupement.

### **1.3.3 Caractères biochimiques**

#### **1.3.3.1 Catalase**

Il s'agit de la recherche de l'enzyme responsable du catabolisme du peroxyde d'hydrogène. Le principe consiste à mettre en contact une colonie de la souche à identifier avec une goutte de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (10V). La présence de l'enzyme se traduit par un dégagement immédiat des bulles gazeuses (**Health Protection Agency, 2011**).

#### **1.3.3.2 Type respiratoire**

Ce test est effectué selon les recommandations de **Guiraud (1998)**. La gélose viande foie répartie en tube est liquéfiée par un chauffage au bain-marie à 45°C. L'ensemencement est réalisé en enfonçant une pipette Pasteur contaminée au fond du tube, celle-ci est

remontée en décrivant une spire de façon à ensemercer uniformément le milieu sur toute la hauteur. Les tubes sont incubés ensuite à 30°C pendant 48 heures.

### **1.3.3.3 Test de mannitol -mobilité**

C'est une gélose molle conditionnée en tubes qui permet d'étudier la fermentation du mannitol et la mobilité des bactéries.

L'ensemencement est réalisé par piqûre centrale jusqu'au fond des tubes à l'aide d'une pipette Pasteur. La fermentation du mannitol se traduit par un virage du milieu au jaune. Les bactéries mobiles diffusent à partir de la ligne d'ensemencement, créant un trouble dans le milieu alors que les bactéries immobiles poussent uniquement le long de la strie d'ensemencement (**Gerhardt et al., 1994**).

### **1.3.3.4 Test au citrate de Simmons**

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

Les germes sont ensemencés en stries sur les tubes qui contiennent le milieu de citrate de Simmons incliné. Après l'incubation, la croissance sur ce milieu s'accompagne généralement d'une alcalinisation provoquant le virage de couleur du vert au bleu vif (**Harley et Prescott, 2002**).

### **1.3.3.5 Test de croissance sur le milieu Triple Sugar Iron (TSI)**

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

#### **1.3.3.6 Hydrolyse de l'esculine**

Ce test est réalisé sur une gélosé contenant la bile à esculine. Après incubation de la culture à 30°C pendant 24 heures, l'hydrolyse de l'esculine libère l'aglycone qui est décelé par une réaction chimique en présence de sel de fer et donne une couleur noire au milieu de culture (De VOS *et al.*, 2009).

### **1.3.4 Évaluation des caractères extrêmophiles des isolats**

#### **1.3.4.1 Croissance à différentes températures**

Afin d'évaluer la plage de température pour lesquelles les souches isolées peuvent donner une croissance visible, nous avons procédé à l'incubation à différentes températures (4°C, 25°C, 30°C, 37°C, 45°C et 55°C). Pour cela, le bouillon nutritif estensemencé puis incubé pendant 24heures.

#### **1.3.4.2 Croissances à différents pH**

De même, des tubes contenant du bouillon nutritif à différents pH (2, 5, 7, 9 et 11) sontensemencés puis incubés à 30°C pendant 24 heures. Un trouble dansle bouillon signifié une croissance microbienne.

#### **1.3.4.3 Tolérance à la salinité**

La tolérance à la salinité est réalisée en ensemencant deux milieux nutritifs, le bouillon (liquide) et la gélose (solide), chaque milieu contient une concentration déterminée de (p/v) NaCl (5,7.5, 10, 15 et 20).L'incubation est réalisée à 30°C. Cette incubation dure 24 heures pour le bouillon et peut aller jusqu'à 6 jours pour la gélose (Litchfield *et Gillevet*, 2002).

L'évaluation de la croissance est traduite par l'apparition des colonies sur la gélose.Pour le bouillon, la densité optique est mesurée à 580 nm puis référée à la table McFarland (Joshi *et al.* 2008). Les tests sont réalisés en triplicata pour chaque souche.

### **1.3.5 Évaluation de la formation des biofilms**

Les souches isolées sont étudiées jusqu'à lors sous leurs formes planctoniques. Afin d'évaluer leur pouvoir à former les biofilms, le test au cristal violet est réalisé pour chaque souche.

Pour cela, les microplaques en silicone à 96 puits sont utilisées. 200  $\mu\text{L}$  d'une suspension jeune à la densité de  $10^8$  cellules /mL sont placés dans les puits de la microplaque, celle-ci est incubée à  $30^\circ\text{C}$  pendant 24h. Les puits sont lavés à l'aide d'eau de robinet, après une fixation par éthanol pendant 10 minutes et 200  $\mu\text{L}$  de Cristal violet (2%) leur sont ajoutés. Après 20 minutes, le cristal violet est retiré des puits et un second lavage est réalisé (Figure 4). Trois répétitions sont réalisées pour chaque souche

L'évaluation de la formation des biofilms est réalisée à l'œil nu. Plus l'intensité de la couleur du Cristal violet retenu dans les puits est importante, plus la bactérie a de chance à former les biofilms (**iGEM WPI Worcester, 2018**).

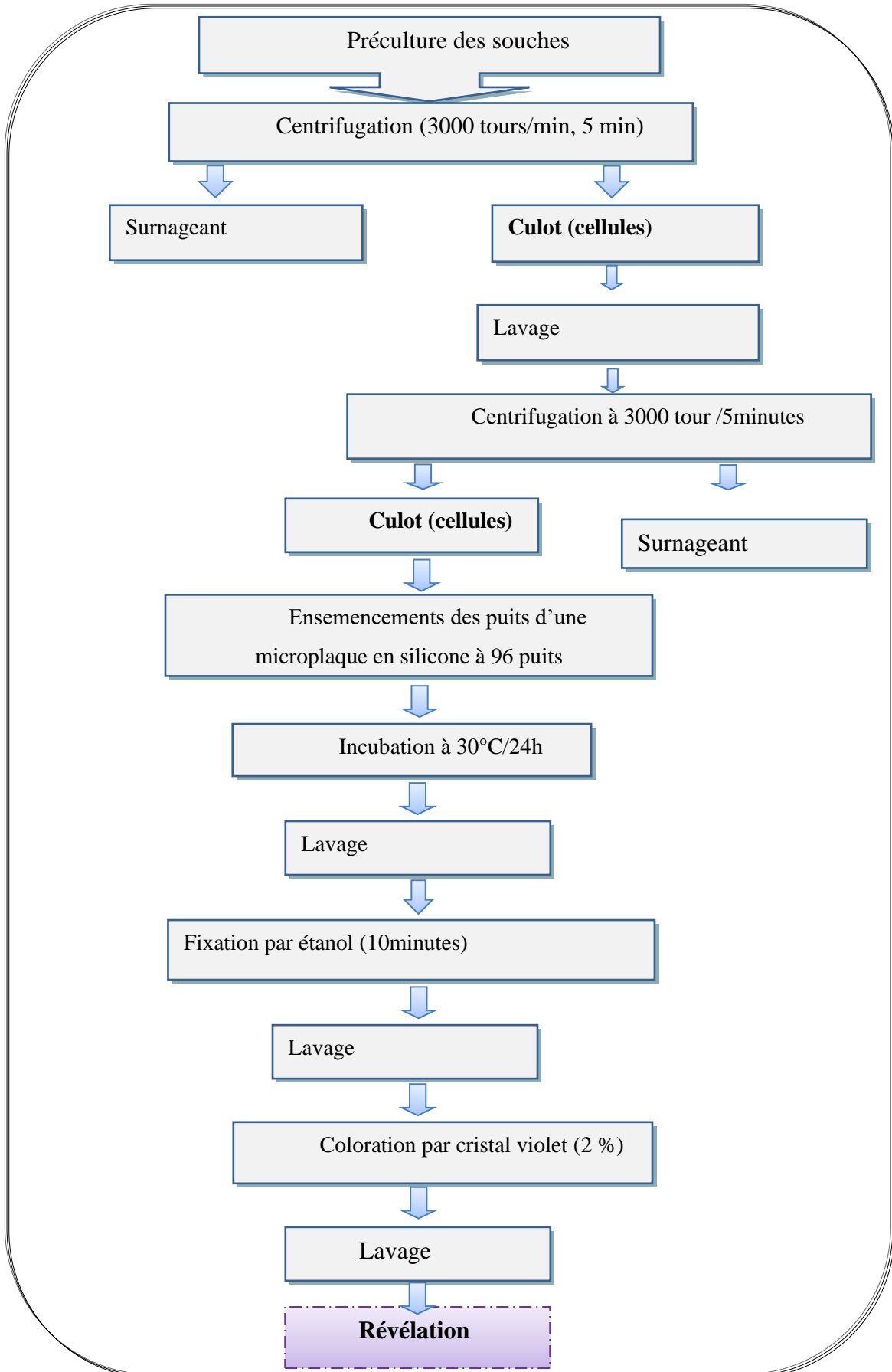


Figure 5. Organigramme des étapes de révélation de la formation des biofilms.

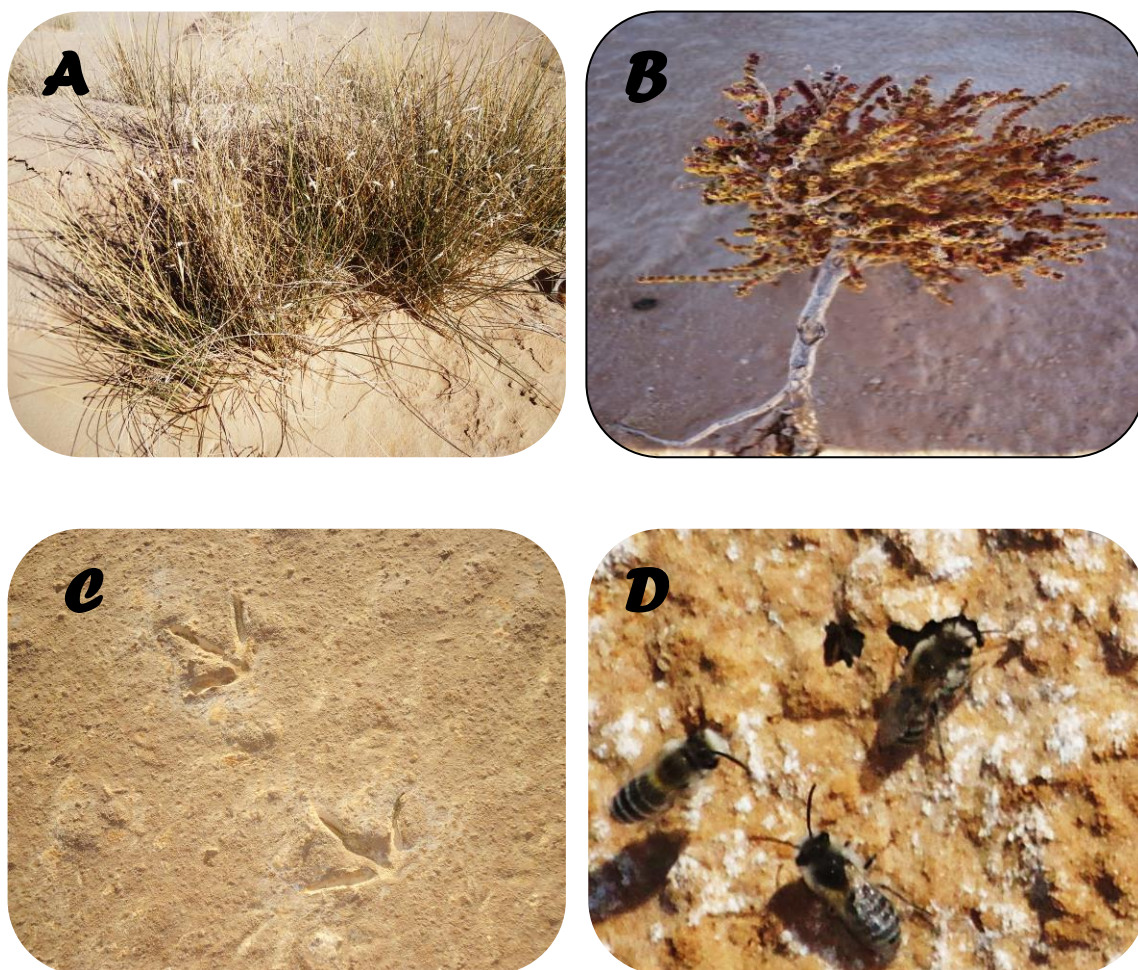
*Résultats et  
Discussion*

### 1.4 Prélèvements

D'après les résultats obtenus, le sol de la Sebka de Naâma présente un caractère halomorphe avec la présence d'un premier horizon superficiel sableux et un deuxième horizon à texture argileuse d'une dimension variable avec la présence des cristaux des sels. La déflation exercée par le vent en période sèche sur des formations à texture fine (sels) entraîne la floculation des argiles en petits agrégats faits des cristallisations salines se présentent sous une multitude de microcristaux de sel (**Moussa, 2006**).

Nous avons observé une ceinture végétale contournant la sebka, elle est constituée principalement de *Retama retama* et *Salsola vermiculata* (**figure 6**). Ce sont des plantes caractéristiques des zones salées et sont présentes durant toute l'année. Nous avons observé aussi des traces d'oiseaux et des insectes durant leur vie larvaire à l'âge adulte ; ce qui représente d'excellents indicateurs de l'état écologique de ces milieux (**Barnaud et Fustec, 2007**).

En effet, les milieux humides sont des réserves de biodiversité importantes. Des macros aux micros habitats, les sebkhas sont des lieux privilégiés pour de nombreuses espèces animales, végétal et d'insectes (**Marcon, 2014**).



**Figure 6.** Faunes et flores observés dans la sebkha de Naâma.  
A : *Retama retama*, B : *Salsola vermiculata* ; C : Traces des oiseaux ; D : diptère.

### 1.5 Analyses physico-chimiques de sol

A partir des sites de prélèvements, 10 échantillons sont prélevés à partir de cinq sites de prélèvement, P1 – P5. Un 6<sup>ème</sup> prélèvement (P6) est effectué à la surface du sol. Les résultats des propriétés physicochimiques des échantillons, à savoir le pH, la conductivité électrique, l'humidité et le taux de carbone total sont résumés dans le tableau suivant.

**Tableau 5.** Résultats des analyses physico-chimiques du sol de la sebkha de Naâma.

Sites de Prélèvement	Echantillons	pH	Humidité (%)	CE (mS/Cm)	Taux de carbone total (%)
<b>P1</b>	<b>P1S1</b>	8.10	7.47	1.94	10.54
	<b>P1S2</b>	7.85	16	2	9.83
<b>P2</b>	<b>P2S1</b>	7.78	19.14	2.23	8.45
	<b>P2S2</b>	7.36	23.48	2.98	5.45
<b>P3</b>	<b>P3S1</b>	7.43	21.11	2.29	5.72
	<b>P3S2</b>	7.34	24.3	2.30	5.29
<b>P4</b>	<b>P4S1</b>	7.61	25.33	2.10	7.44
	<b>P4S2</b>	7.9	25.50	2.32	6.43
<b>P5</b>	<b>P5S1</b>	7.16	20.78	6.96	6.59
	<b>P5S2</b>	7.25	20.93	6.48	6.92
<b>P6</b>	<b>P6</b>	7.36	19.76	2.37	6.44

D'après les résultats obtenus (Tableau 5), les échantillons se caractérisent par des valeurs de pH variables, allant de 7.16 à 8.10. En se référant à **Baize (2000)**, le sol de la

sebkha est neutre à légèrement alcalin. Il est à noter que le pH diminue en allant vers la profondeur dans les sites P1, P2 et P3. Cependant, le contraire est observé dans les sites P4 et P5. Le pH du site P6 est de 7.36.

Ces valeurs de pH sont proches à celles obtenues dans l'étude de **Lounis et Didi (2017)** effectuée dans la sebkha de Naâma.

Pour l'humidité, nos échantillons se caractérisent par des taux d'humidités variables entre 7.47 et 25.50 et ce, d'un site à l'autre. L'humidité est, en effet, c'est un paramètre nécessaire à la vie des microorganismes et aussi à leurs déplacements, le développement optimum varie avec l'espèce du microbe considéré et avec la nature des sols (**Karabi, 2010**).

Toutefois, si on se réfère aux travaux de **Lee et Hwang (2002)**, le sol du site P1 peut être qualifié de faible humidité contrairement aux autres sites.

D'une manière générale, le taux d'humidité dans le sol de la sebkha de Naama est proportionnelle avec la profondeur. De plus, ce taux augmente de la périphérie de la sebkha vers le centre (Tableau 5).

En ce qui est de la mesure de la conductivité électrique, elle varie entre les différents sites de prélèvements de 1.94 et 6.96 mS/Cm. Le sol des échantillons P1S1 et P1S2, avec des conductivités électriques respectives de 1.94 et 2 mS/Cm, peut être considéré comme sol salé. Tandis que celui de P2S1, P2S2, P3S1 et P3S2, P4S1 et P4S2 est qualifié de sol très salé. En revanche, P5S1 et P5S2 caractérisent un sol extrêmement salé (>6). La conductivité électrique de P6 est de 2.37 mS/Cm (Tableau 5).

La conductivité électrique reflète la minéralisation des sols, elle est rigoureusement proportionnelle à la salinité (**Richard, 1969**). La forte teneur en sels s'explique par les fortes évaporations dues aux températures élevées de la région (**Ayad, 2011**).

Le taux de carbone total des échantillons analysés est compris entre 5.45 et 10.54. Pour les prélèvements P2S2, P3S1, P3S2, P4S2, P5S1 et P5S2, ce taux est compris entre 5.45 et 6.92 ; c'est un taux faible puisqu'il est inclus dans l'intervalle (4.0 - 7.0) établi par **Lee et**

Hwang (2002). Cependant, P1S1 et P1S2 ont un taux très élevé de carbone total (>11.0), alors que P2S1 et P4S1 se caractérisent par un taux modéré.

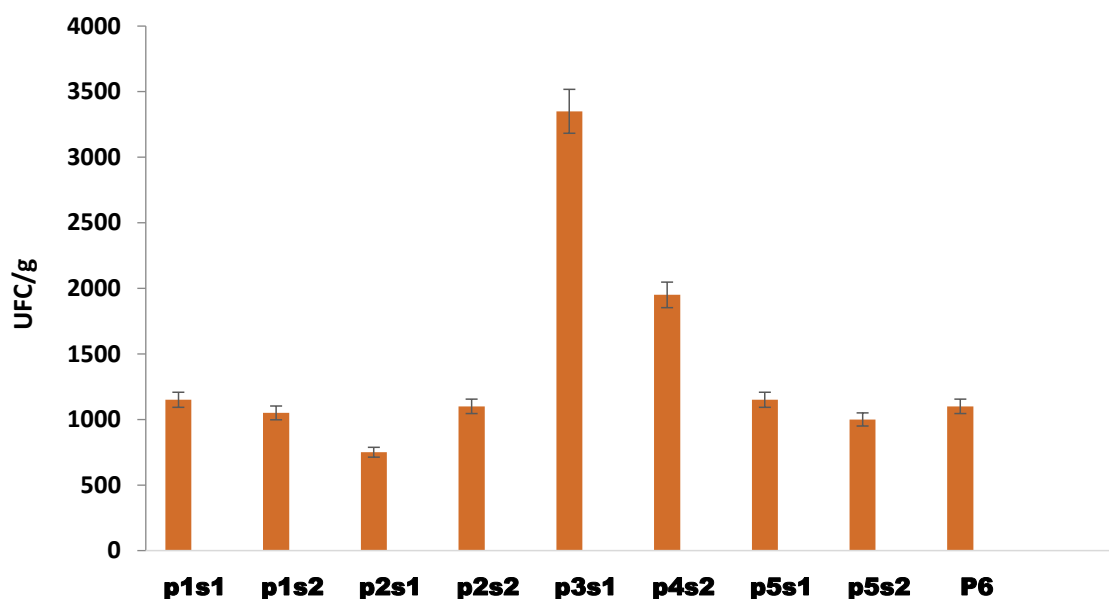
Il est à noter que les sites de prélèvements, P4 et P5 se trouvent dans un endroit émergé par les eaux usées qui sont conduites vers la sebkha (Figure 4).

### 1.6 Analyses microbiologiques

#### 1.6.1 Isolement, purification et conservation

Selon l'aspect des colonies, Vingt-trois souches (S1 –S23) ont pu être isolées des différents échantillons.

D'après les résultats obtenus du dénombrement des unités formant colonies (UFC), le sol de la sebkha de Naâma abrite une charge microbienne importante (Figures 7).



**Figure 7.** Diagramme de dénombrement d'unité formant colonies des différents échantillons sur gélose

Selon cette figure, le nombre d'Unité Formant Colonie par gramme (UFC/g) de sol prélevé varie d'un site à l'autre. Il va de  $750 \pm 50$  UFC/g pour l'échantillon P2S1 à  $3350 \pm 150$  UFC/g pour P3S1.

Les échantillons P1s1, P1s2, P2s2, P5s1, P5s2, P6 présentent une charge microbienne moins importantes (figure 7).

Il s'est avéré que la charge microbienne du sol de la sebkha de Naâma augmente en se dirigeant de la périphérie vers le centre de la sebkha.

Il est à noter aussi qu'il nous a été impossible de faire l'énumération des unités formant colonies des échantillons P3S2 et P4S1 puisque la charge microbienne est fortement élevée. Il est important de rappeler, cependant, que ces échantillons proviennent de deux sites qui se trouvent à proximité de la zone où sont versées les eaux usées de la ville de Naâma.

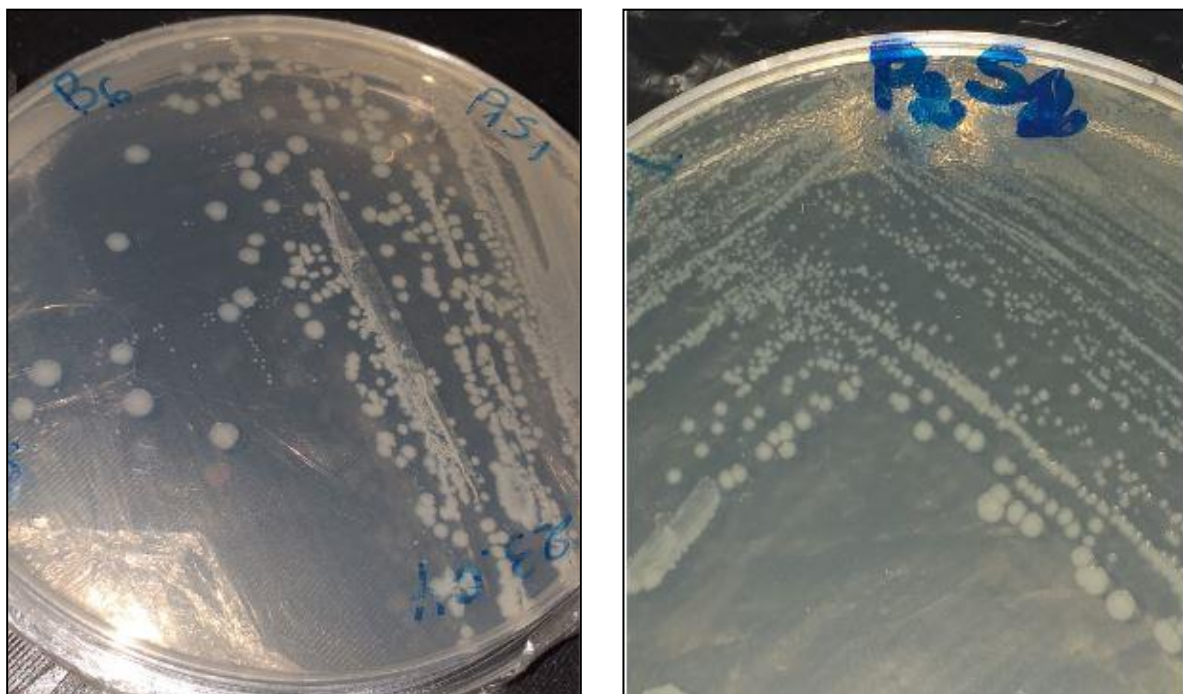
### **1.6.2 Identifications des isolats**

La caractérisation macroscopique et microscopique des souches est reportée dans le tableau 3. Il est important de signaler que l'ensemble des résultats de l'identification des souches isolées est regroupé dans l'Annexe I. Toutes les souches ont formé des colonies blanchâtres sur milieux de culture solides, elles ont un aspect crémeux à surfaces lisses, élevées, circulaires à bords réguliers/irréguliers et dont les diamètres varient de 1 à 5 mm.

Signalons que les colonies de la souche S13 se sont présentées sous forme filamenteuse à surfaces bombées crémeuses d'une couleur transparent. Tandis que celles de S21 sont jaunâtres à surfaces élevées et circulaires (tableau 6).

**Tableau 4.** Résultats de l'aspect macroscopique/microscopique des souches.

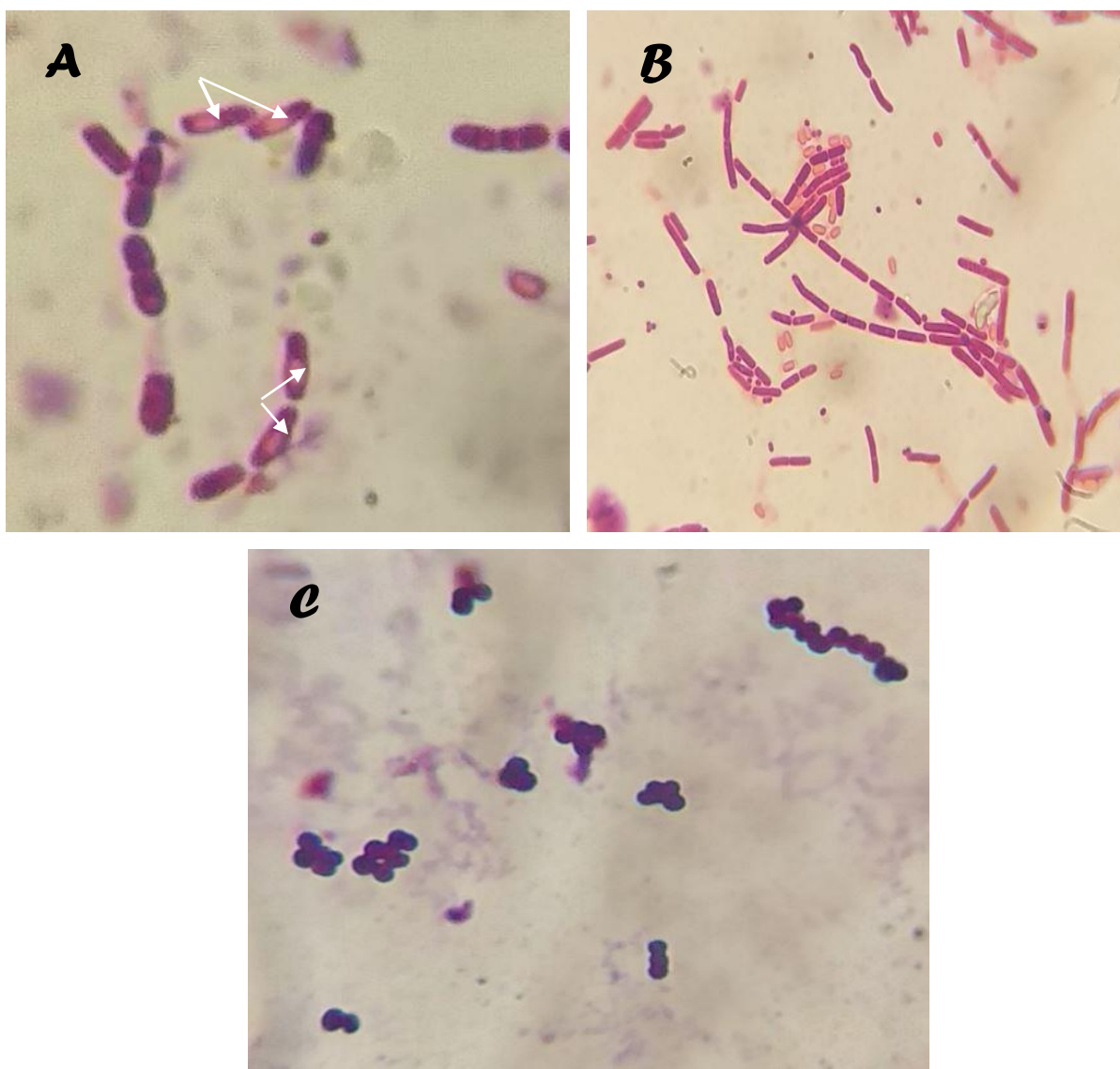
Souches	Pigmentation des colonies	Morphologie des colonies	Coloration de Gram	Morphologie cellulaire
S1	Blanchâtre	Circulaire élevée	+	Bacille
S2	Blanchâtre	Circulaire élevée	+	Bacille
S3	Blanchâtre	Circulaire élevée	+	Bacille
S4	Blanchâtre	Circulaire convexe	+	Cocci
S5	Blanchâtre	Circulaire élevée	+	Bacille
S6	Blanchâtre	Circulaire élevée	+	Cocci
S7	Blanchâtre	Circulaire élevée	+	Cocci
S8	Blanchâtre	Circulaire élevée	+	Bacille
S9	Blanchâtre	Circulaire convexe	+	Cocci
S10	Blanchâtre	Irrégulière élevée	+	Bacille
S11	Blanchâtre	Irrégulière élevée	+	Bacille
S12	Blanchâtre	Circulaire élevée	+	Bacille
S13	Crémeuse	Filamenteuse bombée	+	Bacille
S14	Blanchâtre	Circulaire élevée	+	Bacille
S15	Crémeuse	Circulaire élevée	+	Bacille
S16	Blanchâtre	Circulaire élevée	+	Cocci
S17	Blanchâtre	Circulaire bombée	+	Bacille
S18	Blanchâtre	Circulaire élevée	+	Bacille
S19	Crémeuse	Circulaire élevée	+	Bacille
S20	Blanchâtre	Irrégulière convexe	+	Bacille
S21	Jaune	Circulaire élevée	+	Bacille
S22	Blanchâtre	Circulaire élevée	+	Bacille
S23	Blanchâtre	Irrégulière convexe	+	Bacille



**Figure 8.** Aspect macroscopique des colonies cultivées sur gélose nutritive, Prélèvement P1 et P2.

L'état frais réalisé vis-à-vis des souches isolées a révélé la mobilité chez 10 isolats bactériens (S1, S2, S3, S4, S6, S7, S9, S10 et S13). En revanche, aucune mobilité visible n'est détectée sous le microscope optique pour les autres souches. Les formes des corps bactériens non pas pu être révélées par l'étude à l'état frais.

Par ailleurs, la coloration de Gram a montré l'appartenance de tous les isolats au groupe de bactéries Gram positif. De plus, une dominance de la forme bâtonnet à extrémités arrondies est enregistrée pour la plupart des souches. Cependant, S4, S6, S7, S10 et S16 ont des formes de cocci disposés en paires ou en chaînettes sans aucune forme sporadique (Figure 9). La coloration double de Gram a révélé également la présence de spore en position subterminale chez les souches S2, S12, et S13.



**Figure 9.** Observation microscopique après la coloration de Gram des souches A : S22 ; B : S12 ; C : S9. Les flèches indiquent les spores.  
*Grossissement x100 à immersion*

Les communautés microbiennes jouent des rôles fonctionnels très importants dans les écosystèmes où elles vivent. La flore bactérienne aérobie sporulée est une flore qui est largement répandue dans la nature. Parmi les milieux naturels, le sol. C'est un véritable réservoir de micro-organismes essentiellement de bactéries, en termes de diversité et de densité.

### **1.6.3 Caractères biochimiques**

#### **1.6.3.1 Mise en évidence d'enzyme respiratoire et du type respiratoire**

Toutes les souches étudiées sont catalase et positives. Elles sont aéro-anaérobies facultatifs (Annexe II).

#### **1.6.3.2 Croissance sur le milieu mannitol-mobilité**

Selon les résultats obtenus du test mannitol-mobilité, la fermentation du mannitol a été observée chez les souches S1, S5, S7, S8, S10, S11, S13, S18, S20, S21 et S22 grâce au virage de la couleur vers le jaune orangé. La diffusion dans la gélose a eu lieu témoignant ainsi la mobilité des isolats sauf pour S5, S8, S11, et S20, se sont révélées immobiles.

#### **1.6.3.3 Test au citrate de Simmons**

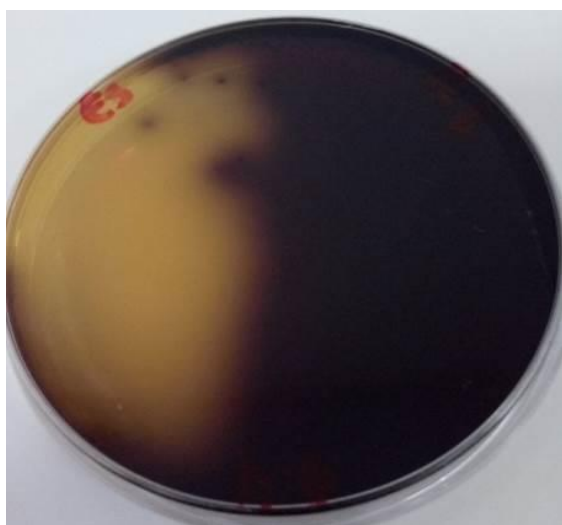
En ce qui concerne l'utilisation de citrate sur le milieu au citrate de Simmons, nous avons constaté que tous les isolats étudiés n'utilisent pas le citrate comme unique source de carbone et d'énergie.

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

Les résultats de la croissance sur le milieu TSI ont montré que l'oxydation du lactose et/ou du saccharose est plus fréquente que la fermentation du glucose. Selon ce même test, il y a absence de production de H<sub>2</sub>S et de CO<sub>2</sub>.

#### **1.6.3.5 Hydrolyse de l'esculine**

La capacité à dégrader l'esculine est observée chez toutes les souches isolées. En effet, un précipité noirâtre est aperçu, il est dû à la réaction de l'esculetine avec les ions Fe<sup>+3</sup> comme le montre la figure 10. Ceci témoigne de la présence de l'esculinase chez les souches isolées.



**Figure 10.** Hydrolyse de l'esculine par la souche S21.

Selon les résultats de l'identification, les souches S1, S2, S3, S5, S8, S10, S11, S12, S13, S14, S15, S17, S18, S19, S20, S21, S22 et S23 appartiennent probablement au genre *Bacillus*. L'identification des souches S4, S6, S7, S9 et S16 oriente vers le genre *Staphylococcus* ou avec une certitude moindre, *Micrococcus* (Figarella et Leyral, 1998).

### 1.6.4 Évaluation des caractères extrêmophiles des isolats

#### 1.6.4.1 Croissance à différentes températures

La gamme de température explorée varie de 4°C à 55°C. 23 isolats tolèrent des variations de températures de 25 à 55°C, Ceci peut s'expliquer par la localisation en régions arides et semi-arides de l'environnement étudié, la sebkha de Naâma. La température de croissance, visiblement, optimale de l'ensemble des souches est située dans la gamme 30°C-37°C. Il s'agit donc selon Mégraud, (2011) de souches mésophiles à légèrement thermotolérantes.

### 1.6.4.2 Croissances à différents pH

Selon les résultats obtenus, aucune souche isolée n'a pu donner lieu à une croissance à pH = 2. L'intervalle de pH permettant la croissance de l'ensemble des souches se situe entre 5,0 et 11,0. De ce fait, nos souches peuvent être qualifiées d'alcalinophiles.

### 1.6.4.3 Tolérance à la salinité

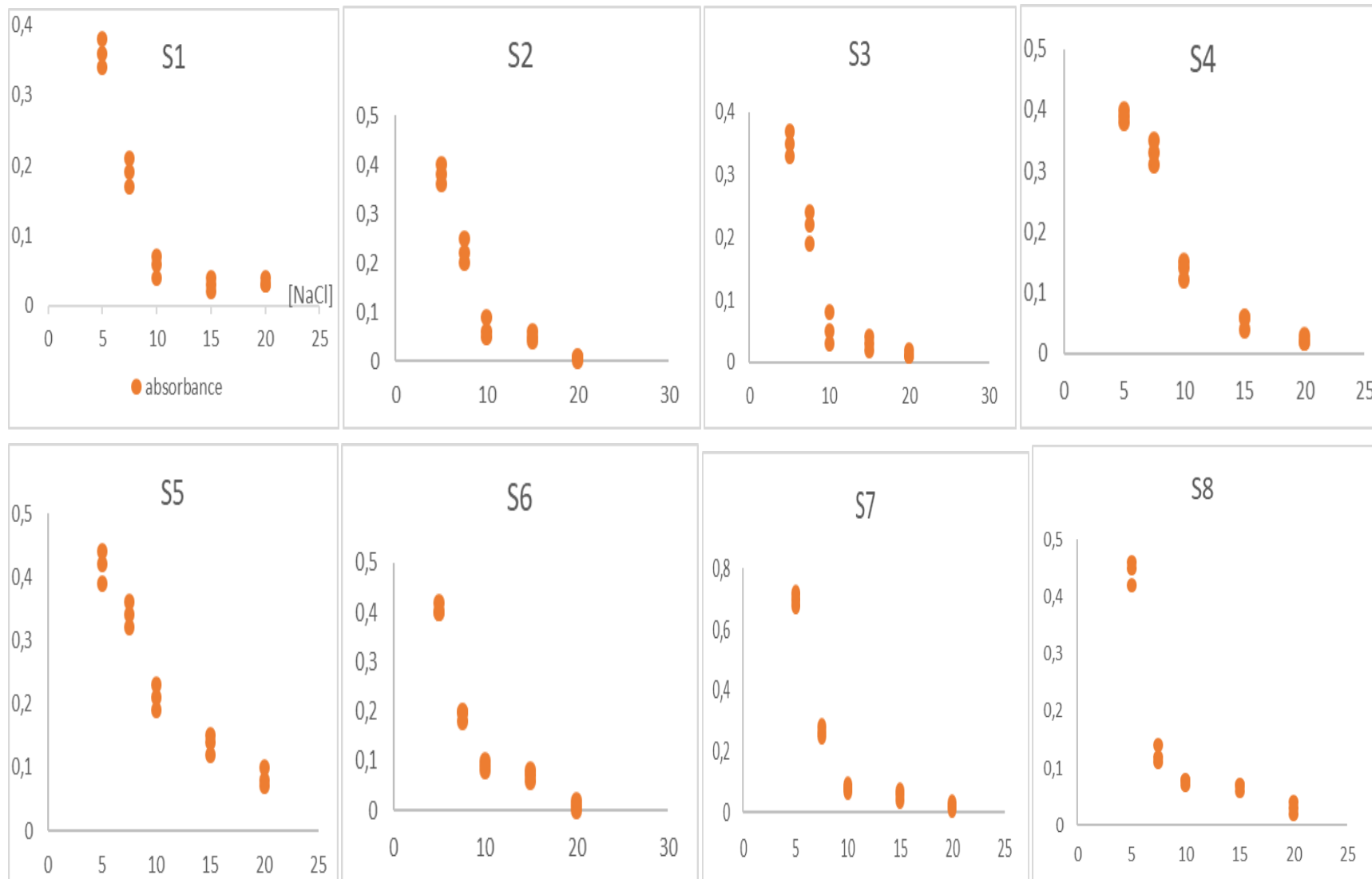
Les résultats de la tolérance aux différentes concentrations de NaCl dans les milieux nutritifs, liquides et solides, sont variables.

Il s'est avéré que les 23 souches isolées ont présenté une croissance dans le milieu de culture liquide contenant des concentrations variables, allant de 5% à 20% (Figure 11).

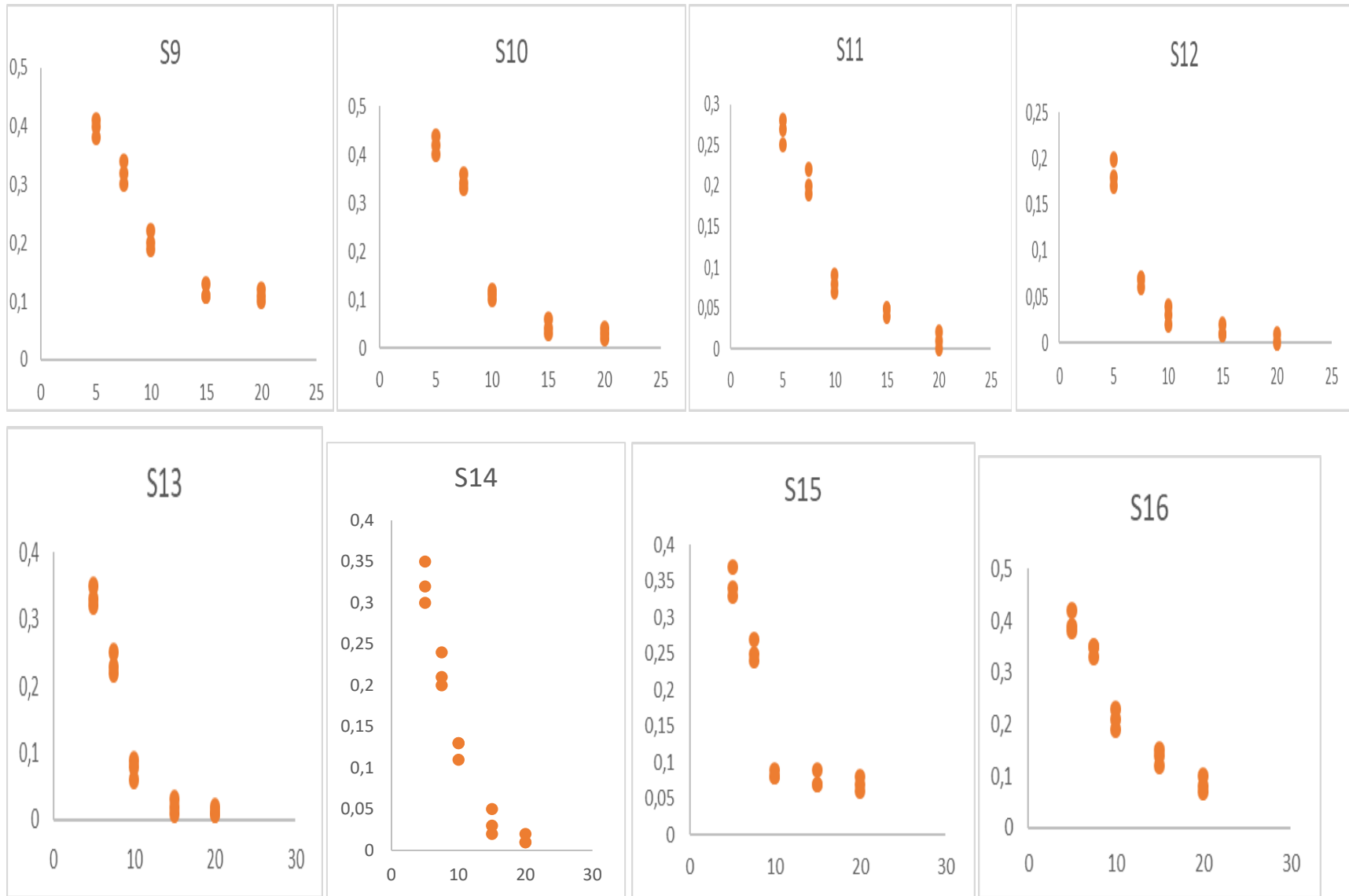
À la lumière de ces résultats et, selon **Echigo et al. (2005)**, on peut conclure que les souches sont halotolérantes, elles n'exigent pas le NaCl pour leur croissance mais elles sont capables de croître en sa présence. En contre partie, leur croissance à des concentrations en NaCl incluses entre 5% et 20% les classe dans le groupe des halophiles modérés selon la définition de **Larsen (1962)**, ce qui n'est pas le cas pour la plupart des bactéries halophiles appartenant au genre *Bacillus* (**Bouali et al., 2016**).

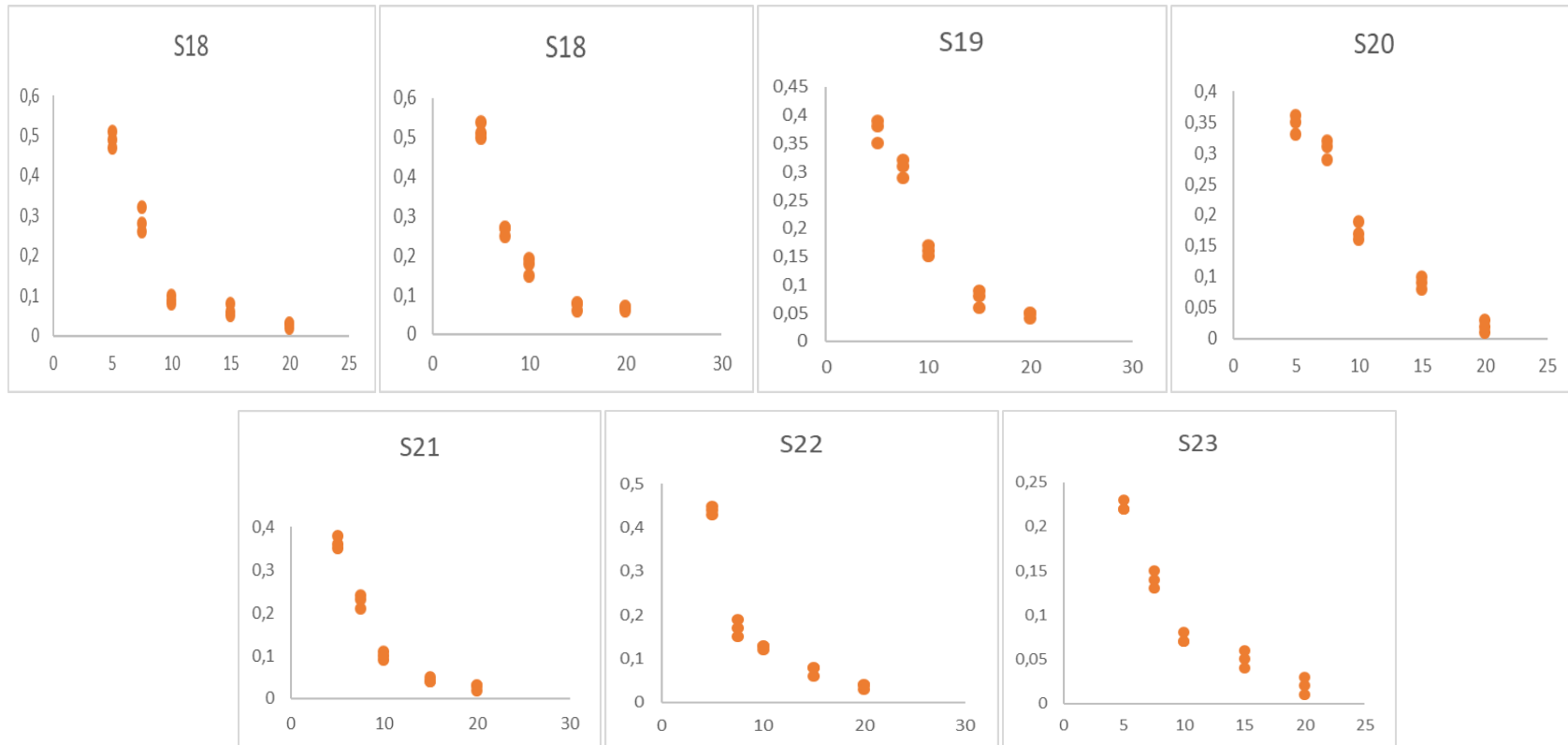
En revanche, après 6 jours d'incubation sur le milieu solide, 23 isolats ont présenté une croissance à 5 % de NaCl, 07 isolats (S6, S9, S13, S15, S16, S18 et S21) ont donné croissance à 10%. Une seule souche, S20, était capable de croître à la concentration saline de 15 % mais aucune croissance n'a été observée à la concentration de 20%.

Selon des études antérieures, les bactéries isolées de zones salines comme les sebkhas sont des halotolérants (**Boutaiba, 2011 ; Boughachiche, 2005**).



**Figure 11.** Tolérances des souches isolées aux différentes concentrations de NaCl (Nuage de point des trois répétitions pour chaque test).

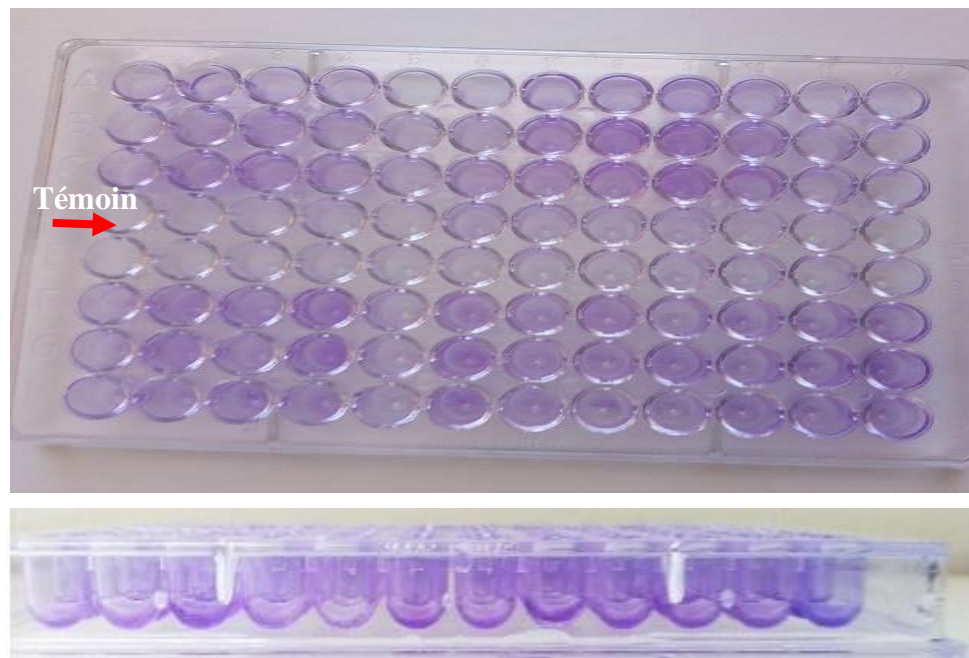




**Figure11.** (suite). Tolérances des souches isolées aux différentes concentrations de NaCl (Nuage de point des trois répétitions pour chaque test).

### 1.6.5 Évaluation de la formation des biofilms

La révélation réalisée visiblement à l'œil nu par rapport au témoin (Figure 12) a révélé l'aptitude de former les biofilms chez 20 souches isolées, cette aptitude varie de moyenne (13 souches) à forte. A contrario, les souches S5, S11 et S16 n'ont pas présenté ce potentiel (Tableau 7).



**Figure 12.** Révélation de l'intensité de la couleur du cristal violet dans les puits des microplaques.

**Tableau 7.**Potentiel de former les biofilms chez les souches isolées.

Souches	Formation des biofilms
S1- S8- S12 - S13 - S15- S17 –S23	+
S2- S3-S4-S6- S7- S9 - S10 - S14 - S18 - S19S20 - S21 - S22	+/-
S5- S11 – S16	-

**+ : forte formation de biofilms, +/- : moyennement formatrice, - : Non formatrice de biofilms**

Selon les travaux publiés antérieurement, **Bouali et al., (2016) ; Alnnansouri (2010)** les bactéries ne formant pas des biofilms avec le même potentiel. En effet, ce pouvoir est présent chez certains microorganismes alors qu’il est absent chez d’autres.

*Conclusion*

L'objectif essentiel de ce travail est d'une part, l'étude des caractères pédologiques du sol de la sebkha de Naâma et d'autre part, l'évaluation de la vie bactérienne des souches extrémophiles dans cet écosystème.

Sur le plan pédologique, le sol de la sebkha se caractérise par un pH neutre à légèrement alcalin ; une conductivité électrique variable, de faible à forte ; une humidité variable et un taux de carbone total voisin de 10 et ce, pendant la période de d'étude (février 2019).

Vingt-trois souches à Gram positif sont isolées à partir de 5 sites de prélèvement ; 18 isolats se présentent sous forme de bâtonnets, alors que cinq souches ont une forme de coque. Ces souches, regroupées en paires ou en chainettes, hydrolysent de l'esculine et sont catalase positive.

L'étude physiologique a révélé qu'il s'agit de souches halotolérantes/halophiles modérés et mésophiles à légèrement thermo-tolérantes. Ces isolats tolèrent également des pH allant de 5 à 11. Dans le but de compléter ce travail, il serait intéressant de réaliser :

- ✓ Prélèvements durant les différentes saisons de l'année.
- ✓ Prélèvement à partir d'autres sites non étudiés de la sebkha
- ✓ Identification biochimiques complètes des souches.
- ✓ Etude pour l'exploitation les souches isolées à des fins industrielles, agronomiques .....

*Références  
bibliographiques*

# Références bibliographiques

- 1. Afnor., 2005.** NF ISO 10381-5, Qualité du sol – Echantillonnage – Partie 5 : lignes directrices pour la procédure d'investigation des sols pollués en sites urbains et industriels.
- 2. Akel H., AL-Quadani F., Atoum M. and Battikhi M., 2008.** Phenotypic and Genotypic Characterization of Three Novel Halophilic *Bacillus* Strains from Jordanian Hot Springs. *Jordan Journal of Biological Sciences*. 1(1).
- 3. Alexandratos N., 2010.** Agriculture mondiale. Edition *Polithechnica*. Paris.
- 4. Alnasouri M., 2010.** étude du développement de biofilms dans des réacteurs de traitement des eaux. thèse de Doctorat, université de Limoges, 197p.
- 5. Amoozegar M. A., Sánchez-Porro C., Rohban R., Hajighasemi M. and Ventosa A., 2009.** *Bacillus persepolensis* sp. nov., a moderately halophilic bacterium from a hypersaline lake. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59: 2352–2358.
- 6. Aslim B., Saglam N. and Beyatli Y., 2002.** Determination of some properties of *Bacillus* isolated from soil. *Turk. J. Biol.*, 26: 41-8.
- 7. Ayad R., 2011.** Screening d'activités hydrolytiques extracellulaires chez des microorganismes halophiles aérobies isolés d'environnements hyper salins de l'Est algérien. Mémoire de Magister, université de Constantine, 118p.
- 8. Baize, D. (2000).** Guide des analyses en pédologie. choix, expression, présentation, interprétation 2 édition, INRA-paris France, 255p.
- 9. Baize D., Jabiol B., 1995.** Guide pour la description des sols. Paris : INRA, 338p.
- 10. Barbouchi M., Lhissou R., Chokmani K., Abdelfattah R., El Harti A.E.R. et Ben Aissa N., 2013.** Caractérisation de la salinité des sols à l'aide de l'imagerie radar satellitaire : cas de la Tunisie et du Maroc. Centre Eau Terre et Environnement, Institut National de la Recherche Scientifique (INRS-ETE). *Québec*
- 11. Barnaud G., Fustec E., 2007.** Conserver les zones humides pourquoi ? comment ? *Educagri, Quae*. Paris, 296p.
- 12. Benabdallah A.M., 2014.** Screening de souches extrêmophiles halophiles du genre *Bacillus* de la Sebka D'Oran (caractérisation phénotypique). Mémoire de master, université de Tlemcen, 101p.

- 13. Bensaid, A., 2006.** Sig et télédétection pour l'étude de l'ensablement dans une zone d'étude : le cas de la wilaya de Naâma (Algérie). Thèse de doctorat en Géographie, Université Es-Senia et Université Joseph Fourier, Algérie et France.
- 14. Bouali W ,Malek F et al ., 2016.** Morphological, physiological and biochemical characterizations of some soil isolates of *Bacillus cereus* group from Algeria. vol :10(29),pp.1094-1103.
- 15. 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. *Journal of Arid Environment.* ; 10: 909–916.
- 16. Boughachiche, F., S. Reghiousa, L. Oulmi, H. Zirezer, M. Kitouni, A. Boudemagh et A. Boulahrouf., 2005.** Isolement d'actinomycètes producteurs de substances antibactériennes à partir de la sebkha d'AinMlila. *Science. Technologie.* 23: 5-10.
- 17. Boutelli M H., 2012.** Salinité des eaux et des sols au niveau de la Sebkhia de bamendil, caractérisation et conséquences sur l'environnement. Mémoire de magistère en aménagement hydraulique dans les milieux arides. Ouargla, P 130.
- 18. Cavicchioli R., Siddiqui K. S., Andrews D. and Sowers K. R. 2002.** Low-temperature extremophiles and their applications. *Current Opinion in Biotechnology* 13: 253–261.
- 19. D'Alessandro C. P., De Castro R. E., Giménez M. I. and Paggi R. A., 2006.** Effect of nutritional conditions on extracellular protease production by the haloalkaliphilic archaeon *Natrialba magadii*. *Lett Appl. Microbiol.*, 44 : 637–642.
- 20. DasSarma S., 2001.** Halophiles. *Encyclopedia of Life Sciences*: pp 1-9.
- 21. DasSarma S. and Arora P., 2002.** Halophiles. *Encyclopedia of Life Sciences, London, Nature Publishing Group*; 8:458-466.
- 22. Demnati F., 2013.** Biodiversité et Enjeux Socio-économiques des lacs salés (Chotts et Sebkhias) d'Algerie. Cas du Chott Merouane et Melghir. Thèse de doctorat, Université de Mohamed Khider- Biskra, 203p.
- 23. De Vos P., Garrity G. M., Jones D., Krieg N. R., Ludwig W., Rainey F. A., Schleifer K. H. and Whitman W. B., 2009.** *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd edition. Volume Three, the *Firmicutes*. Springer, New York, USA.

- 24. Donlan Rm, Costerton Jw., 2002.** Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin. Microbiol. Rev.*, 15, 167-193.
- 25. D.P.S.B de Naâma,** 2013. Monographie de la wilaya de Nâama. 164p.
- 26. Ebel C., Madern D., et Zaccai G., 2004.** Molecular adaptation of halophilic proteins. *Extremophiles* 2:1-7.
- 27. Echigo A., Hino M., Fukushima T., Mizuki T., Kamekura M. and Usami R., 2005.** Endospores of halophilic bacteria of the family *Bacillaceae* isolated from non-saline Japanese soil may be transported by event (Asian dust storm) *Saline Systems*, 1:8.
- 28. F.A.O. (1960).** La défense contre l'érosion éolienne. Food and Agriculture Organisation of the United Nations, Rome, 99 p.
- 29. Figarella J et Leyral G., 1998.** Documentation technique 2e éditions Bordeaux:CRDP d'aquitaine ,304p.
- 30. García L., 2002.** La vie dans les milieux extrêmes. Texte de la 433ème conférence de l'Université de tous les savoirs : 1.
- 31. Gerday C., Glansdorff N., 2007.** Physiology and biochemistry of extremophiles. *ASM press, Washington, DC*. P. 450.
- 32. Gerhardt P., Murray R. G. E., Wood W. A., Krieg N. R., 1994.** Methods for General and Molecular Bacteriology. Washington, DC. ASM. P. 791.
- 33. Ghassemi, F., A.J. Jakeman, et H.A. Nix., 1995.** Salinisation of land and water resources: human causes, extent, management and case studies. Center for resource and environmental studies, The Australian National University, Canberra, Australia. 125 pages.
- 34. Gouga H., 2014.** Biodiversité faunistique à Sebket Bazer (Sud de Sétif) connaissance et conservation. Mémoire de magister, Université de Ferhat Abbas-Sétif 1, 174p.
- 35. Harley J.P., Prescott L.M., 2002.** Laboratory Exercises in Microbiology, Fifth Edn. *Debook*, P. 449.
- 36. Health Protection Agency., 2011,** Oxidase Test. UK Standards for Microbiology Investigations.
- 37. Horikoshi K., 1999.** Alkaliphiles: some applications of their products for biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 63: 735–750.
- 38. ITAB, 2002.** Activités biologique et fertilité du sol, 23p.

- 39. Irwin J. A., Baird A. W., 2004.** Extremophiles and their application to veterinary medicine. *Irish Veterinary Journal*. Volume 57 (6).
- 40. Joshi A. A., Kanekar P. P., kelkar A. S., Shouche Y. S., Vani A. A., Borgave S. B., and Sarnaik S. S., 2008.** Cultivable bacteria diversity of alkaline. Lonar Lake India. *MicrobEcol*, 55: 163–172.
- 41. Kaurichev, I. S., 1980.** Practicas de Edofologia. Ed : *Mir Publishers*, Moscow.
- 42. Karabi. M., 2010.** Fonctionnement microbiologique et biochimique des sols sahariens:étude comparative entre sol salés (palmeraies de l'université d'Ouargla) et sol alluvionnaire(palmeraie traditionnelle de Guerrara), mémoire de magister, université Ouargla, 76p.
- 43. Kharroub K., Quesada T., Ferrer R., Fuentes S., Aguilera M., Boulahrouf A., Ramos Cormenzana A.,Monteoliva-Sánchez M.,2007.** *Halorubrum ezzemoulense* sp. nov., a halophilic archaeon isolated from Ezzemoulsabkha, Algeria. *Int J Syst Evol Microbiol* 56: 1583–1588.
- 44. Kristjansson J. K. and Hreggvidsson G. O., 1995.** Ecology and habitats of extremophiles. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 11, 17-25.
- 45. Kushner D.J.,1978.** Life in high salt and solute concentrations. In: Kushner D.J *Microbial Life in Extreme Environments*.ed : *Academic Press London*. Pp. 317-368.
- 46. Larsen H., 1962.** Halophilism. In: Vreeland R.H. and Hochstein L.I. Ed: *The Biology of Halophilic Bacteria* .Boca Raton, CRC Press.
- 47. Lavelle, P., et A.V. Spain., 2001.** Soil ecology. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, The Netherlands. 654 pages.
- 48. Lee J.Y. and Hwang B.K., 2002.** Diversity of antifungal action mycetes in various vegetative soils of Korea. *can. J. Microbiol.* 48:407-417.
- 49. Litchfield C.D. and Gillevet M.P., 2002.** Microbial diversity and complexity in hypersaline environments: A preliminary assessment. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*; 28:48-55.
- 50. MacElroy R. D. 1974.** Some comments on the evolution of extremophiles. *Biosystems* 6:74-75.

- 51. Madigan M. T. and Martino J. M. 2006.** Brock Biology of Microorganisms, 11th ed.; Pearson Education: Upper Saddle River, N. J., USA.
- 52. Marcon E., 2014.** Mesures de la biodiversité. Documents CNRS, INRA. Ecologie des forêts de Guyanne. 101p.
- 53. Mezaache S., 2012.** Localisation des déterminants de la suppression de quelques souches de *Pseudomonas* isolées de la rhizosphère de la pomme de terre. Thèse de doctorat, Université de Ferhat Abbas-Sétif, 221p.
- 54. Mégraud F., 2011.** De l'agent infectieux à l'hôte-bactériologie : Physiologie bactérienne, Pouvoir pathogène des bactéries. Cours PCEM 2: 1-6.
- 55. Moussa K., 2006.** Etude d'une Sebkhia : la Sebkhia d'Oran (Ouest algérien). Thèse de doctorat, Université d'Oran, 205p.
- 56. Munns, R. 2009.** Strategies for Crop improvement in Saline Soils. Chapter 11. *In* M. Ashraf, M. Ozturk, H.R. Athar (ed.), Salinity and water stress, improving crop efficiency, Springer Science. Business Media B.V.
- 57. Nakagawa T., Ishibashi J., Maruyama A., Yamanaka T., Morimoto Y., Kimura H., Urabe T. and Fukui M., 2004.** Analysis of dissimilatory sulfite reductase and 16S rRNA gene fragments from deep-sea hydrothermal sites of the Suiyo Seamount, Izu-Bonin Arc, Western Pacific, *Appl. Environ. Microbiol.*, 70, 393–403.
- 58. Ollivier B., Caumette P., Garcia J. L. and Mah R. A., 1994.** Anaerobic bacteria from hypersalin environments. *Microbiology Reviews* 58, (1), 27-38.
- 59. Oren, A., 1999.** Bioenergetic aspects of halophilism. *Microbiol. Mol. Boil. Rev.* **63**: 334-348.
- 60. Peduzzi R., Tonolla M., Boucher-Rodoni R., 2006.** Milieux extrêmes: Conditions de vie en milieu alpin et milieu marin, Actes et contributions scientifiques : 9.
- 61. Pikuta et al., 2007.** Microbial extremophiles at the limits of life. *Crit Rev Microbiol.* 33(3):183-209.
- 62. Rabhi N.E.H., 2011.** Isolement de *Pseudomonas spp.* fluorescents d'un sol sale. Effet d'osmoprotecteurs naturels. Mémoire de magister, Université de Ferhat Abbas-Sétif, 130p.
- 63. Rebiahi S.-A., Rahmoun M., Seddiki S.M.L., Kadi K., Belhadji F., Chabni N. , Kunke D., 2014.** Nosocomial infections caused by *Staphylococcus aureus* biofilm producer in

the neonatal unit of the hospital specialist mother-child of Tlemcen, Algeria. *Journal de pédiatrie et de puériculture* 27, 228-235.

**64. Richards L.A., 1969.** Diagnostic and improvement of saline and alkaline soils. *Agriculture Handbook*. No.60.

**65. Roger, P. et J. L. Garcia., 2001.** Introduction à la microbiologie du sol. *Acad. Press Inc.* 15-32.

**66. Shivanand P. and Jayaraman G., 2009.** Production of extracellular protease from halotolerant bacterium, *Bacillus aquimaris* strain VITP4 isolated from Kumta coast. *Process Biochemistry*. 1088–1094.

**67. Stanley Nr, Lazazzera Ba., 2004.** Environmental signals and regulatory pathways that influence biofilm formation. *Mol. Microbiol.*, 52, 917-924

**68. iGEMWPI Worcester., 2018.** Crystal Violet Biofilm Assay. *Protocole*. 1-2.

**69. Tiquila S. M., Davis D., Hadid H., Kasparian I., Sahly Shim S. and Murray K. S., 2006.** Halophilic and halotolerant bacteria from river waters and shallow groundwater along the rouge river of southern Michigan. *Environment Technology*; 28: 297-307.

**70. Vincent W. F., Mueller D. R. and Bonilla S., 2004.** Ecosystems on ice: the microbial ecology of Markham Ice Shelf in the high Arctic. *Cryobiology* 48, 103–112.

**71. Yoon J. H., Kang K. H. and Park Y. H., 2003.** *Halobacillus salinus* sp. nov., isolated from a salt lake on the coast of the East Sea in Korea. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53, 687–693.

**72. Zair M., 2011.** Bilan écologique et socio-économique des reboisements dans la wilaya de Naâma et perspectives d'avenir, Université Abou Bekr Belkaid - Tlemcen.

# *Annexes*

## **AnnexeI .composition de la gélose et du bouillon nutritif**

### **Gélose nutritive (GN)**

Peptone	15 g
Extrait de viande	10g
Extrait de levure	2,0g
Chlorure de sodium	5,0g
Agar	20g
Eau distillée	1000ml

pH =6,8-7,4

### **Bouillon nutritif (BN)**

Peptone	15g
Extrait de levure	5,0 g
Chlorure de sodium	5,0g
Eau distillée	1000ml

pH = 7,2

## Annexe II. Tests d'identification des isolats

Souches	Forme	Gram	Catalase	Mannitol Mobilité	Esculine	Type Respiratoire	Tests de température (C°)						Croissance à pH				
							4°C	25C	30C	37C	45C	55C	2	5	7	9	11
S1	Bacille	+	+	+/+	+	AAF	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
S2	Bacille	+	+	+/-	+	AAF	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
S3	Bacille	+	+	+/-	+	AAF	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
S4	Cocci	+	+	+/-	+	AAF	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
S5	Bacille	+	+	-/+	+	AAF	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
S6	Cocci	+	+	+/+	+	AAF	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
S7	Cocci	+	+	+/+	+	AAF	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
S8	Bacille	+	+	-/+	+	AAF	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
S9	Cocci	+	+	+/-	+	AAF	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
S10	Bacille	+	+	+/+	+	AAF	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
S11	Bacille	+	+	-/+	+	AAF	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
S12	Bacille	+	+	-/-	+	AAF	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
S13	Bacille	+	+	+/+	+	AAF	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
S14	Bacille	+	+	+/-	+	AAF	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
S15	Bacille	+	+	+/-	+	AAF	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
S16	Cocci	+	+	+/-	+	AAF	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
S17	Bacille	+	+	+/-	+	AAF	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
S18	Bacille	+	+	+/+	+	AAF	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
S19	Bacille	+	+	+/-	+	AAF	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
S20	Bacille	+	+	-/+	+	AAF	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
S21	Bacille	+	+	+/+	+	AAF	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
S22	Bacille	+	+	+/+	+	AAF	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
S23	Bacille	+	+	+/-	+	AAF	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+

\*AAF : aéro-anaérobie facultatif    + : résultat positif    - : résultat négatif

## ملخص

تختلف الظروف البيئية على سطح الارض اذ نجد ان هنالك ظروف عادية وأخرى غير عادية مثل التي تمثلها السبخة وهو موضوع بحثنا. تمت هذه الدراسة على تربة السبخة بالنعامه بالتوازي مع الدراسة الميكروبيولوجية. وتبين أن تربة السبخة معتدلة وذات ملوحة متغيرة من منخفضة إلى مالحة للغاية مع اعتدال في نسبة الكربون اضافة الى ذلك تم عزل 23 سلالة بكتيرية معظمها عصيات عزلت من خمسة مواقع لعمقين 15-30سم

معظمها Gram positif قادرة او غير قادرة على تشكيل وهي في شكل ازواج او سلاسل حيث كانت

.Endospore

وتمت دراستها في تركيزات مختلفة من كلوريد الصوديوم، في درجات الحموضة وفي درجات حرارة متفاوتة مما سمح لنا بتحديد المجموعات البكتيرية المختلفة القادرة على العيش في الظروف قاسية.

الكلمات المفتاحية : سبخة النعامه، الملوحة ، علم التربة *Bacillus*، *extrêmophilie*.

## Abstract

Outside of the so-called normal living conditions, there are places where the living conditions are extreme, as sebkhas. For that, the microbial life in the soil of the Sebkhah of Naâma was the object of our research. A pedological study was carried out in parallel with the microbiological one. It was found that the soil of sebkha was neutral to slightly alkaline and variable salinity, ranging from low to extremely salty with moderate carbon content. In addition, twenty-three bacterial strains, mainly *Bacillus*, were isolated from five sampling sites from two depths, 15 and 30 cm. These are gram positive rods grouped in pairs or in chains, capable of forming or not subterminal endospores. The study of the growth of isolates at different concentrations of NaCl, at acidic and alkaline pH and at variable temperatures, made it possible to identify different bacterial groups.

**Keywords:** Sebkhah of Naâma, Salinity, pedology, *Bacillus*, extremophilia.

## Résumé

En dehors des conditions de vie dite normal, il existe des endroits où les conditions de vie sont extrêmes, comme les sebkhas. Cette approche a menée à la recherche de la vie microbienne dans le sol de la Sebkhah de Naâma. Une étude pédologique est réalisée en parallèle avec celle microbiologique. Il s'est révélé que le sol de la sebkha est neutre à légèrement alcalin et d'une salinité variable, de faible à extrêmement salée avec un taux de carbone modéré. Par ailleurs, vingt-trois souches bactériennes, majoritairement des *Bacillus*, sont isolées à partir de cinq sites de prélèvements en deux profondeurs, 15 et 30 cm. Celles-ci sont des bâtonnets Gram positif, groupés en paires ou en chainettes et capables de former ou non des endospores subterminale. L'étude de la croissance des isolats à différentes concentrations de NaCl, aux pH acides et alcalins et à des températures variables ont permis de recenser différents groupes bactériens.

**Mots clés :** Sebkhah de Naâma, Salinité, pédologie, *Bacillus*, extrêmophilie.