

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE MOULOUD MAMMERI DE TIZI-OUZOU



FACULTE DES SCIENCES BIOLOGIQUES ET DES SCIENCES AGRONOMIQUES
DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE-MICROBIOLOGIE

Mémoire de fin d'études

En vue de l'obtention du diplôme de Master

Filière : Biotechnologie

Spécialité : Biotechnologie Microbienne

Thème

**Caractérisation des bactéries halotolérantes
isolées à partir d'une Sebkhia au Nord Algérien**

Présenté par :

- ❖ M^{elle} MEZANI Louiza
- ❖ M^{elle} MEZIANI Warda

Soutenu devant le jury composé de :

M ^{me} BENZAOUZ K.	M.C.B	UMMTO	Présidente
M ^{me} ASMANI K. L.	M.C.A	UMMTO	Promotrice
M ^r BOUACEM K.	M.C.A	UMMTO	Examineur

Année Universitaire : 2021 - 2022

Remerciements

Nous remercions **Dieu** tout puissant, qui nous a donné la santé et nous a guidé sur le chemin de la science et nous a permis de mener à bien ce travail.

Nous remercions infiniment notre promotrice **M^{me} ASMANI Katia Louiza**, Maître de Conférences Classe A, à l'Université de Mouloud MAMMERIE de TIZI-OUZOU, de nous avoir accordé l'honneur de diriger ce travail sans la moindre hésitation, de nous avoir orienté, conseillé, soutenu le long de son élaboration. Sincèrement madame, nous ne pouvons que vous exprimez notre respect et notre gratitude étant toujours présente pour les discussions, la vérification du bon déroulement du travail du début jusqu'à la fin. Nous avons pris plaisir à travailler avec vous.

Nous n'oublierons pas de remercier tous les membres du laboratoire pédagogique de microbiologie essentiellement **M^{me} HEMDADE Soraya** et **M^{me} GENDOUIZI Sonia**, pour l'aide permanente qu'elles nous ont apportés tous au long de notre pratique, et pour toute liberté d'action qu'elles nous ont donné. Grâce à vos conseils précieux et à votre supervision malgré tous les obstacles, ce travail a pu voire jour. Pour cela, nous tenons à vous exprimer notre reconnaissance.

Nous remercions **M^{me} BENAZZOUZ Kinza**, Maître de Conférences Classe B, à l'Université de Mouloud MAMMERIE de TIZI-OUZOU, d'avoir accepté de faire partie de notre jury, et de nous avoir fait l'honneur de présider notre jury.

Nos remerciements vont également à **M^r BOUACEM Khelifa**, Maître de Conférences Classe A, à l'Université de Mouloud MAMMERI de TIZI-OUZOU, d'avoir accepté de faire partie de notre jury, examiner et participer à l'évaluation de notre travail.

Nous exprimons nos profonds remerciements à **M^{me} TERBOUCHE Lynda** membre de laboratoire QUAR.TECH pour son aide, ainsi que tous les travailleurs de ce laboratoire.

Enfin, C'est un devoir d'exprimer notre remerciement à travers ce modeste travail à tous ceux qui ont facilité, de près ou de loin, la réalisation et l'élaboration de ce mémoire. Votre aide, vos conseils, votre présence, vos encouragements nous ont été très utiles, Merci infiniment.

Dédicaces

Avec l'expression de ma reconnaissance, je dédie ce modeste travail à ceux qui, quels que soient les termes embrassés, je n'arriverais jamais à leur exprimer mon amour sincère.

À mon défunt **père Meddour** qui aurait bien voulu voir cet instant, que sa fille unique qui a toujours rêvé et s'efforcée d'atteindre ses objectifs malgré les difficultés est maintenant diplômée, que Dieu, le tout puissant, l'ait en sa sainte miséricorde. J'espère, cher père, que tu es fier de ta fille qui t'aime.

À mon défunt **frère Ahmed**, que Dieu, le tout puissant, l'ait en sa sainte miséricorde.

À ma très chère **mère Djouher** pour son amour, sacrifices, aide, et soutien, qui m'a toujours encouragé tout au long de mes études que Dieu la garde et la protège.

À mon cher **frère Mokrane**, que Dieu le donne une longue et joyeuse vie.

À mes chers sœurs **TEBBOUL Sara, LOUAGE Ouiza**, qui n'ont pas cessé de me conseiller, encourager et soutenir tout au long de mes études et particulièrement en période de mon stage pratique du début jusqu'à la fin. Que Dieu les protège et leurs offre la chance et le bonheur.

À **KEBOUR Nour El Houda, MENAD Wissam, LARBI Sarah**, qui ont partagé les mêmes moments que moi, parfois difficile et d'autres drôles durant tout le long de notre pratique. Je vous souhaite, les filles, du succès et de l'éclat dans votre vie, et quelle merveilleuse rencontre, que Dieu nous réunira dans de plus belles choses.

À tous mes chers amis **kahina, Leaticia, Massi, Rima** et à ma **section 2^{ème} année Master Biotechnologie Microbienne promotion 2021-2022**, que Dieu vous donne santé, bonheur, courage, chance et surtout réussite.

Et bien sûr je dédie ce travail à **moi-même** et à tous mes **alters** qui m'ont accompagné malgré tout et ne m'ont pas quitté, pas un instant. Merci infiniment.

À **Tonton Farid** merci d'avoir été ma raison de vivre, jamais je ne t'oublierai.

Eylul

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail accompagné d'un profond amour :

À la mémoire de **mon père** que Dieu garde son âme dans son vaste paradis.

À ma très **chère mère** ; quoi que je fasse ou je dise je ne saurai point te remercier comme il se doit.

À mon **frère Smail** ; tu as toujours été à mes côtés pour me soutenir et m'encourager.

À mon **oncle Abderrahmane** ; pour leur soutien moral, ses sacrifices et son affection et la confiance qu'il m'a accordée.

Aussi à tous les membres de ma **famille** pour leur soutien moral et tous ceux qui ont participé à ma réussite.

Warda

Figure 01: situation géographique de quelques Chotts et Sebkhas en Algérie	4
Figure 02: Sebkha fluviolacustre de la région de Ghinayyin (Sultanat d'Oman)	5
Figure 03 : Sebkha interdunaire dans les champs de dune de Liwa (UAE)	5
Figure 04: Sebkha marine d'El Watban (UAE)	6
Figure 05: Famille des plantes présentes dans une Sebkha d'Oran	8
Figure 06 : Dosage de la matière organique dans le sol.....	13
Figure 07 : Dosage du calcaire actif.....	15
Figure 08 : Dosage du phosphore.....	17
Figure 09 : Dosage de l'azote.....	19
Figure 10 : Dosage des sulfates.....	21
Figure 11 : Dosage des carbonates.....	23
Figure 12 : Dosage des bicarbonates.	24
Figure 13 : Différentes étapes de la préparation des dilutions décimales.	26
Figure 14 : Recherche de la nitrate réductase.	29
Figure 15 : Observation macroscopique de quelques isolats.....	38

Tableau 01 : Principaux taxons de microorganismes dans une Sebkha.	8
Tableau 02: Classe granulaire.....	11
Tableau 03: Classification du sol selon le pH.	12
Tableau 04: Niveau de conductivité électronique des sols.....	12
Tableau 05 : Norme d'interprétation pour la matière organique.....	14
Tableau 06 : Classification des sols selon le pourcentage de calcaire (CaCO₃).....	16
Tableau 07 : Normes d'interprétation pour le phosphore assimilable.....	18
Tableau 08 : Norme d'interprétation pour l'azote.	20
Tableau 09 : Norme d'interprétation pour le dosage des sulfates.	22
Tableau 10 : Norme d'interprétation des carbonates dans un sol.	25
Tableau 11: Résultats des analyses physico-chimiques du sol.	35
Tableau 12 : Différents types d'isolats obtenus dans chaque milieu de culture à différentes températures.	36
Tableau 13: Caractères cultureux des souches.....	37
Tableau 14 : Etude microscopique des isolats bactériens.....	39
Tableau 15 : Résultats des tests biochimiques.	48
Tableau 16 : Résultats des activités enzymatiques.....	49
Tableau 17 : Physiologie de la croissance des souches en fonction de la température, du pH et du NaCl.	50

E

EPS = Exo-Polysaccharides

H

HA = Acide Hyaluronique

N

NR1 = Acide Sulfamique

NR2 = α - naphtalamine

P

PDA = N-diméthyl-paraphénylène diamine

PHA = Polyhydroxyalcanoates

PHB = Hydroxybutyrates

S

S = Souche

SAPG = Sérine alcaline peptides de *Gracilibacillus boraciitolerans* LO15

SAPV = Sérine alcaline peptides de *Virgibacillus natechei* FarDT

T

TSI = Triple Sugar Iron

Remerciements

Dédicaces

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

Introduction.....1

Synthèse bibliographique

Chapitre 1 : Environnements salins et hypersalins

1. Environnements salins et hypersalins..... 2

1.1 Types de milieux hypersalins 2

2. Sebkhass 3

2.1 Définition..... 3

2.2 Types et classifications des sebkhass..... 4

2.2.1 Types de Sebkhass.....4

2.2.2 Classification des Sebkhass.....6

2.2.2.1 Classification selon le bilan hydrologique.....6

2.2.2.2 Classification selon le milieu de formation.....7

2.3 Caractéristiques des sebkhass.....7

2.3.1 Flore végétale.....7

2.3.2 Faune.....8

2.3.3 Microorganismes.....8

2.4 Exploitation et application des sebkhass8

Matériel et méthodes

Cadre de l'étude.....	10
Echantillonnage du sol.....	10
1. Matériel	10
2. Méthodes	10
2.1 Analyse pédologique du sol.....	10
2.1.1 Analyse physique	10
2.1.1.1 analyse granulométrique.....	10
2.1.2 Analyse physico-chimique.....	11
2.1.2.1 Mesure du pH.....	11
2.1.2.2 Mesure de la conductivité électrique.....	12
2.1.2.3 Mesure de la teneur en matière organique.....	12
2.1.2.4 Dosage du calcaire total et actif.....	14
2.1.2.5 Dosage du phosphore assimilable.....	16
2.1.2.6 Dosage de l'azote total.....	18
2.1.2.7 Dosage des Sulfates.....	20
2.1.2.8 Dosage des chlorures.....	22
2.1.2.9 Dosage des carbonates et bicarbonates.....	23
2.2 Isolement, purification et conservation des souches	25
2.2.1 Milieux d'isolement	25
2.3 Technique d'ensemencement	25
2.4 Caractérisation des souches.....	26
2.4.1 Etude phénotypique	26
2.4.1.1 Etude macroscopique.....	26
2.4.1.2 Etude microscopique.....	27
2.4.2 Etude des caractères biochimiques	27

2.4.2.1 Test catalase.....	28
2.4.2.2 Test oxydase.....	28
2.4.2.3 Galerie biochimique classique.....	28
2.4.3 Mise en évidence de quelques activités hydrolytiques extracellulaires	33
2.4.3.1 Recherche de la cellulase.....	33
2.4.3.2 Recherche de l'amylase.....	33
2.4.3.3 Recherche de la caséinase.....	34
2.4.3.4 Recherche de lipase.....	34
2.4.3.5 Recherche de la lécithinase.....	34
2.4.4 Etude des caractères physiologiques	34
2.4.4.1 Influence de la température sur la croissance.....	34
2.4.4.2 Influence du pH sur la croissance.....	34
2.4.4.3 Influence de la salinité sur la croissance.....	34

Résultats et discussion

I . Résultats	35
1. Analyse pédologique.....	35
1.1 Analyses physico-chimiques.....	35
2. Isolement des bactéries.....	36
2.1 Caractérisation des isolats bactériens.....	36
2.1.1 Etude phénotypique.....	36
2.1.1.1 Etude macroscopique.....	36
2.1.1.2 Etude microscopique.....	38
2.1.2 Tests biochimiques.....	47
2.1.3 Criblage enzymatique.....	49
2.1.3.1 Recherche de l'amylase.....	49
2.1.3.2 Recherche de la cellulase.....	49
2.1.3.3 Recherche de lécithinase.....	49

2.1.3.4 Recherche de caséinase.....	49
2.1.3.5 Recherche de lipase.....	50
2.1.4 Etude des caractères physiologique.....	50
2.1.4.1 Croissance à différentes températures.....	50
2.1.4.2 Croissance à différentes gammes de pH.....	50
2.1.4.3 Croissance à des concentration croissantes de NaCl.....	51
II. Discussion.....	52
Conclusion.....	55
Références bibliographiques.....	56
Annexes	



Introduction

En Afrique du Nord et plus précisément en Algérie, les zones endoréiques sont répandues sous forme de chotts et de sebkhas (Demnati et *al.*, 2017). La sebkha est un mot arabe désignant une dépression fermée temporairement occupée par un lac salé, tandis que le chott désigne une zone salée entourant la sebkha (Dubost, 2002). En Algérie, les Chotts et les sebkhas s'étalent du Sud tunisien jusqu'à la région Atlas au Nord algérien ; plusieurs d'entre eux figurent sur la liste Ramsar des zones humides d'importance internationale (Semraoui et Semraoui, 2008).

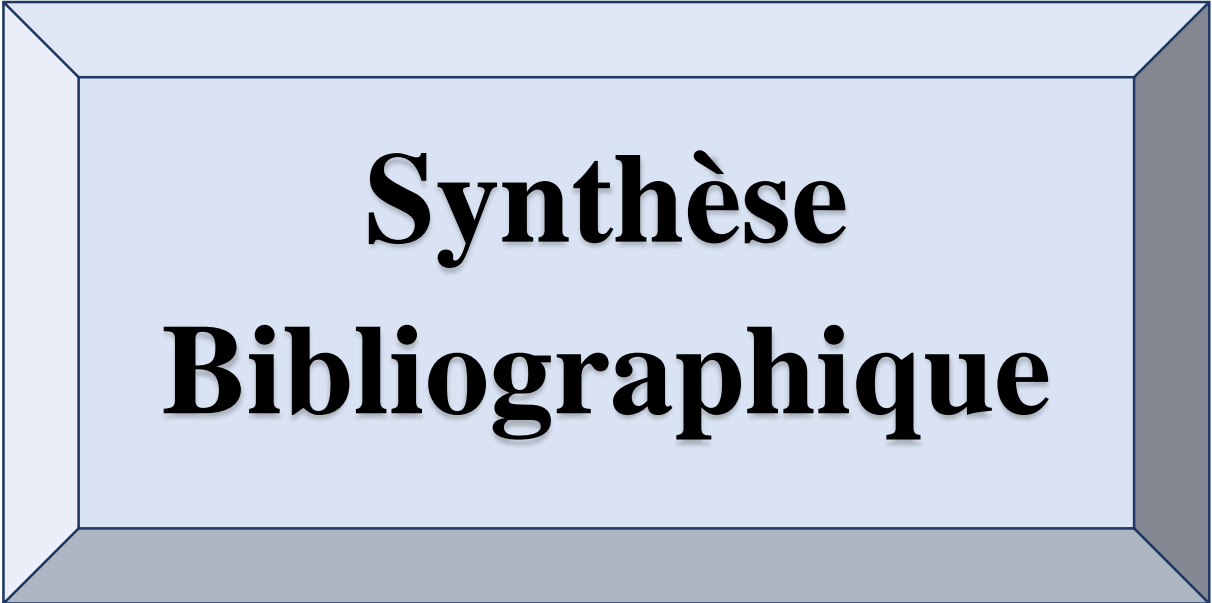
Ces écosystèmes se distinguent par leur emplacement géographique, les conditions environnementales qui s'y trouvent et les communautés biologiques qui s'y développent (Sahli, 2021). Ces dernières années, la diversité microbienne des environnements hypersalins a été largement explorée à l'aide de techniques culture-dépendantes et culture-indépendantes (Chamekh et *al.*, 2019 ; Cui et Dyll-Smith, 2021 ; Saibi et *al.*, 2022), et les procaryotes halophiles et halotolérants ont été trouvés dans de nombreux environnements salins tels que les lacs salés et les sols salins (Menasria et *al.*, 2018).

Les bactéries halophiles sont des microorganismes qui nécessitent obligatoirement la présence du sel (généralement le chlorure de sodium) pour leur croissance, tandis que les bactéries halotolérantes n'ont pas besoin de sel, elles sont capables de se développer en présence ou en absence du sel (Cayol et *al.*, 2017). Les microorganismes halophiles et halotolérants ont développé des stratégies adaptatives pour fonctionner dans des conditions aussi extrêmes (Didari et *al.*, 2020). L'étude de ces microorganismes permet de comprendre les mécanismes impliqués dans l'adaptation au stress salins, et d'exploiter leurs métabolites résistants aux conditions extrêmes, pour des applications biotechnologiques. En effet, les milieux hypersalins constituent une source importante de microorganismes halophiles et halotolérants qui peuvent fournir des enzymes d'intérêt industriel (Oren, 2010 ; Chamekh et *al.*, 2019).

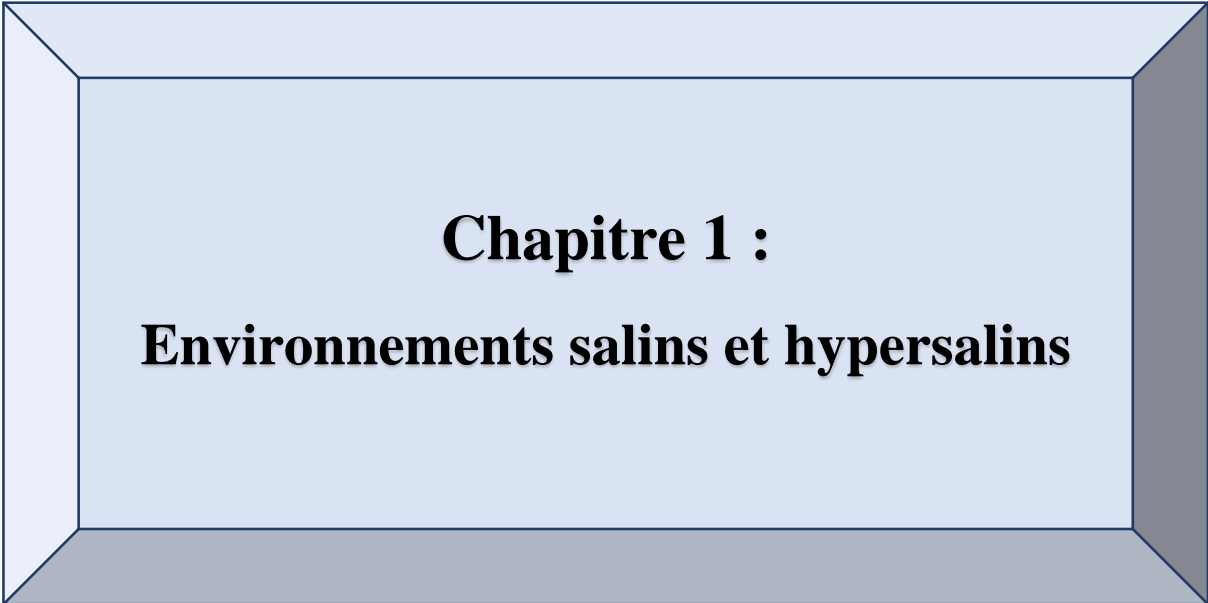
L'objectif de ce travail est l'isolement et la purification de souches bactériennes halotolérantes à partir d'un sol d'une Sebkha située au Nord-Ouest algérien et connue pour sa salinité élevée. Une étude des caractères physiologiques des isolats (température, pH et salinité) a été également réalisée.

Ce travail est scindé en deux parties :

- La première partie est consacrée à une synthèse bibliographique qui regroupe des généralités sur les environnements salins et hypersalins, notamment les sebkhas, et sur les bactéries halophiles et halotolérantes.
- La seconde partie est expérimental ; dont la première partie consiste à faire une étude pédologique de l'échantillon de sol, afin de tirer les différentes caractéristiques remarquables. Comme deuxième partie de ce travail, a été consacré à la méthodologie utilisée pour l'isolement et la caractérisation des différentes souches isolées, dont le matériel utilisé est présenté en annexe, et un second chapitre qui présente et discute l'ensemble des résultats obtenus au cours de cette étude pour en dégager des conclusions et des perspectives.



Synthèse
Bibliographique



Chapitre 1 :
Environnements salins et hypersalins

1. Environnements salins et hypersalins

Partout dans le monde, il existe de nombreux environnements salins, la majorité sont localisés dans des sites secs et chauds (Delgado-Garcia et *al.*, 2015). Ces environnements sont principalement représentés par les eaux et les sols salés. Un environnement est considéré hypersalin lorsque la concentration en sels est supérieure à celle de l'eau de mer, qui est d'environ 35 g.L^{-1} (DasSarma et DasSarma, 2017).

Plusieurs facteurs environnementaux influencent ces environnements, notamment, la température, le pH et une faible disponibilité des nutriments et de l'oxygène. De ce fait, ces milieux sont considérés comme des milieux extrêmes (Ventosa et *al.*, 2015). Les composants majeurs de ces environnements sont le sodium et le chlorure suivies en abondance par le dioxyde de soufre (SO_2) (Ben Abdellah et *al.*, 2016), ainsi que d'autres types de minéraux tels que le chlorure de potassium (KCl), le sulfate de magnésium (MgSO_4), le sulfate de calcium (CaSO_4) et le chlorure de magnésium (MgCl_2) (Daoud et Ben Ali, 2020).

1.1 Types de milieux hypersalins

Les environnements hypersalins peuvent être divisés en deux principaux types selon leur composition ionique (Faradj Edbeib et *al.*, 2016). Il s'agit des milieux thalassohalins et athalassohalins (Verma et *al.*, 2020). Le point commun entre ces deux milieux est le chlorure de sodium qui précipite sous forme de cristaux d'halite (Mukhtar et *al.*, 2020).

a. Milieux thalassohalins

Ce sont des milieux qui proviennent d'une origine dite océanique ; ils ont été formés au cours du temps par leur séparation des océans d'après Cayol (1995) in Daoud et Ben Ali, (2020). Ces milieux sont caractérisés par des compositions ioniques comparables à celle de l'eau de mer avec des valeurs de pH presque neutres ou légèrement alcalines (Faradj Ebdeib et *al.*, 2016 ; Singh et *al.*, 2019). La plupart de ces milieux sont issus de l'évaporation lente de l'eau de mer, où le chlorure de sodium est le sel prédominant selon Oren (2002) in Didari et al. (2020). Les environnements thalassohalins peuvent être d'origine naturelle comme les sebkhas ou les lagons, ou d'origine anthropique, comme les marais salants (Enache et *al.*, 2017).

b. Milieux athalassohalins

Ce sont des milieux qui proviennent d'une origine dite continentale, ils résultent de la dissolution des sels associés aux roches et aux couches géologiques, provoquée par les eaux de pluie ou de ruissellement d'après Cayol (1995) in Daoud et Ben Ali, (2020). La composition ionique d'un environnement athalassohalin est considérablement différente par rapport à l'eau de mer d'après Oren (2002) in Didari et al. (2020). Dans ce type de milieu, la salinité peut dépasser les 10 % de NaCl (Seck et *al.*, 2018). Lorsque l'évaporation se poursuit, certains changements se produisent dans la composition ionique en raison de la précipitation du sulfate de calcium (CaSO_4) et d'autres minéraux (Verma et *al.*, 2020). Ces milieux sont des sols salins avec des niveaux élevés de chlorure de sodium et d'autres sels tels que le magnésium, le calcium, le potassium, le sulfate et les carbonates (Delgado-Garcia et *al.*, 2015), avec un pH relativement bas, d'environ 6 (Verma et *al.*, 2020).

La mer morte est considérée comme un milieu athalassohalin ; elle est caractérisée par de fortes concentrations de cations divalents (Mg^{2+} et Ca^{2+}) et un pH légèrement acide (pH 5,5-6). Par ailleurs, il existe des environnements athalassohalins alcalins tels que le lac Mono aux États-Unis d'Amérique, le lac Wadi Natrun en Égypte et le lac Magadi au Kenya, qui sont caractérisés par l'absence de cations divalents, et par des concentrations élevées d'ions carbonates (CO_3^{2-}) et hydrogencarbonates (HCO_3^-), responsables de l'alcalinité (Sahli, 2021).

2. Sebkhas

2.1 Définition

La Sebkha est un mot arabe désignant une dépression fermée temporairement occupée par un lac salé. Elle est caractérisée par une abondance de sels solubles concentrés en surface empêchant toute végétation. Le Chott quant à lui désigne une zone salée entourant la Sebkha, qui est le fond humide de la dépression (Dubost, 2002). La végétation halophile apparaît dans les sols moins salés qui entourent la Sebkha (Chamekh et al., 2019). Ces environnements sont généralement limités aux régions arides et semi-arides (Menasria et al., 2018).

Les Sebkhas sont aussi une sorte de lac ou d'étang ouvert salé, et cette salinité est due à l'évaporation des eaux en été, ce qui permet d'avoir un dépôt ou une couche de sel brut, avec une concentration qui varie entre 250 et 330 $g.L^{-1}$ (Demnati et al., 2017). Cette dernière varie selon la saison, du fait de la présence d'une faible pluviosité car l'eau ne séjourne qu'à certain moment de l'année (Faraj-Ebdeib et al., 2016).

L'Algérie compte un nombre important de Sebkhas et de Chotts, et leurs répartitions géographiques est très étendue (Figure 01). La plus grande Sebkha du Nord-Ouest de l'Algérie possède une superficie de 1890 km^2 . Elle est temporairement occupée par un lac salé de 300 km^2 dont la concentration en sel est estimée à plus de 100 $g.L^{-1}$ de sels dissous (Chamekh et al., 2019).

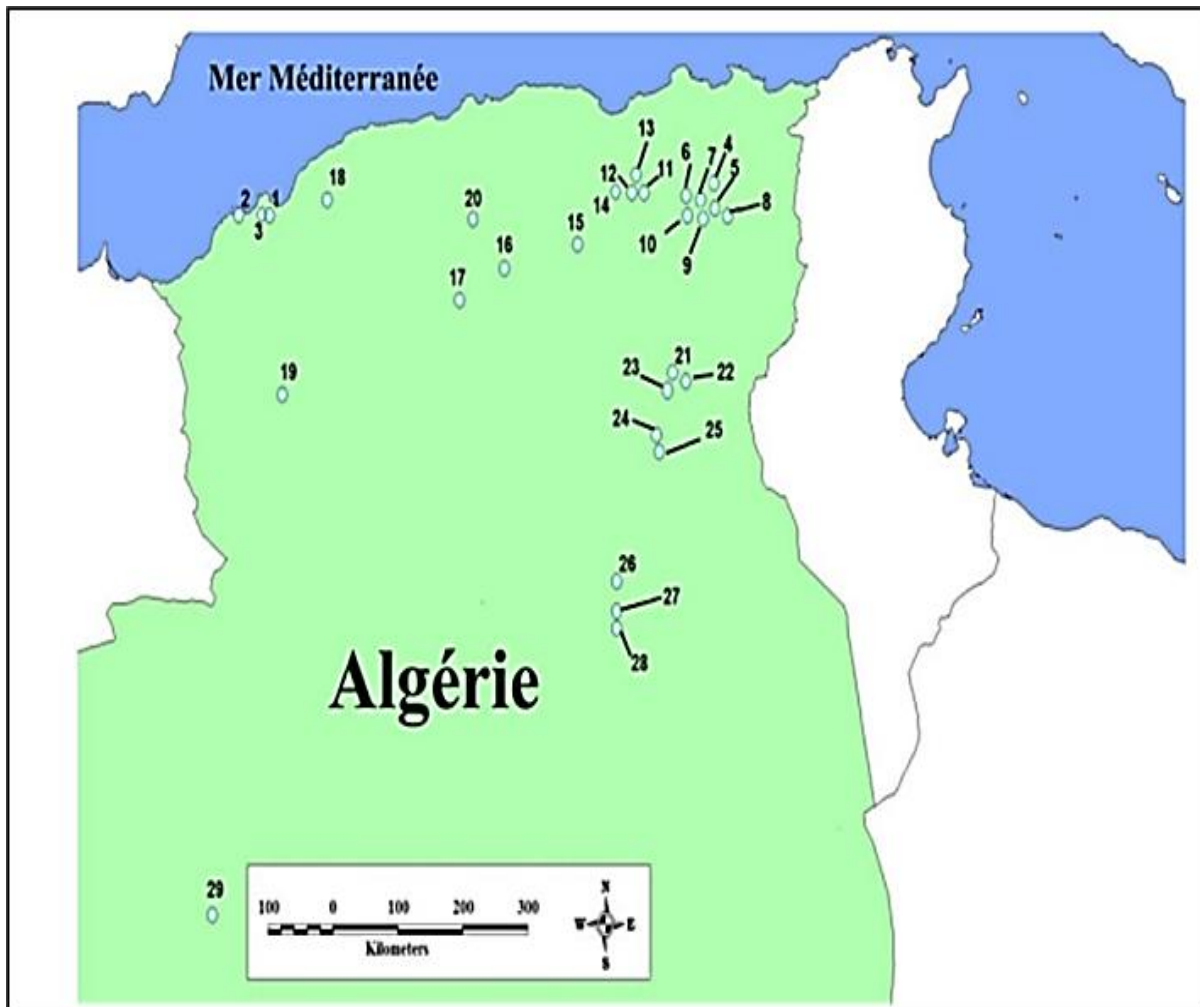


Figure 01: situation géographique de quelques Chotts et Sebkhass en Algérie (Sahli, 2021).
1. Salines d'Arzew, **2.** Sebkhass d'Oran, **3.** Lac Téllamine, **4.** Garaet Ank Djmel, **5.** Garaet Guellif, **6.** Sebkhass Ezzeemoul, **7.** Garaet Merhsel, **8.** Garaet Tarf, **9.** Chott Tinsilt, **10.** Chott Boumia, **11.** Chott El Beidha Hammam Essoukhna, **12.** Chott El Frain, **13.** Sebkhass Bazzar, **14.** Sebkhass El Hamiet, **15.** Chott El Hodna, **16.** Chott Zehrez Chergui, **17.** Chott Zehrez Gherbi, **18.** Sebkhass Sidi Bouziane, **19.** Chott Chergui, **20.** Sebkhass boughzoul, **21.** Chott Melghir, **22.** Chott Boudjloul, **23.** Chott Merouane, **24.** Chott Tindla, **25.** Chott Sidi Amrrane, **26.** Sebkhass Sefioune, **27.** Chott Oum Raneb, **28.** Chott Ain El Beida, **29.** Sebkhass El Maleh.

2.2 Types et classifications des Sebkhass

2.2.1 Types de Sebkhass

On distingue trois grands types de Sebkhass, liés aux conditions de formation spécifique (Fol, 2008).

a. Sebkhass fluviolacustre

Les eaux souterraines d'infiltration dans des bassins hydrographiques peu profonds et l'évaporation par capillarité qui en découle expliquent la formation de telles structures. Aux Sultanats d'Omans, la Sebkhass fluviolacustre située dans la région de Ghinayin (Fol, 2008) (Figure 02).



**Figure 02: Sebkhia fluviolacustre de la région de Ghinayyin (Sultanat d'Oman)
(Mediani, 2016).**

b. Sebkhias interdunaires

Elles correspondent aux lacunes laissées dans les champs de dunes par déflation. Dans les plaines salines où elles se forment, la nappe phréatique est superficielle et permet la formation de séries évaporitiques et notamment du gypse (Fol, 2008) (Figure 03).



**Figure 03 : Sebkhia interdunaire dans les champs de dune de Liwa (UAE)
(Mediani, 2016).**

c. Sebkhia marine ou côtière

Localisée dans la zone supratidale, c'est-à-dire au-delà de la limite de haute mer. Elle est caractérisée par des inondations liées aux tempêtes ou aux grandes marées d'équinoxe. Cette influence marine est également identifiable par la présence de tapis d'algues, les stromatolites (Fol, 2008) (Figure 04).



Figure 04: Sebkhia marine d'El Watban (UAE) (Mediani, 2016).

2.2.2 Classification des Sebkhias

2.2.2.1 Classification selon le bilan hydrologique

Une étude élaborée par Yan (2001), a permis de classer les grands lacs salés du monde en trois (3) types, selon leurs bilans hydrologiques.

a. Lacs éphémères de type (A) « Ephemerallake, short term »

Ce sont des lacs saisonniers, pouvant devenir secs dans un intervalle de temps très court, cela est du à l'élévation de taux d'évaporation. Il s'agit de bassins fermés qui ne reçoivent pratiquement pas de matière minérale dissoute. Dans ce cas le pH est contrôlé seulement par la réaction des minéraux, parce que les protons libérés par les réactions de ces derniers ne peuvent pas être neutralisés par le flux des bicarbonates.

b. Lacs éternels, de longue durée, de type (B) « Perenniallake, long term »

La quantité d'eau dans ce type de lac décroît graduellement dans un grand intervalle de temps. Par contre, la salinité du lac décroît à cause du flux d'eau qui atteint le lac, provoquant la déconcentration des eaux. Le pH du lac est souvent maintenu pendant longtemps à un niveau élevé.

c. Lacs éternels à très grande durée, de type (C) « Large perenniallake, very long term »

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

2.2.2.2 Classification selon le milieu de formation

Les différents types de Sebkhass résultent de leur milieu de formation. Ces Sebkhass ont un point commun ; il s'agit de zones proches 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 carbonates de calcium (CaCO_3), de gypse ($\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), d'anhydrite (CaSO_4) et de chlorure de sodium (NaCl), qui précipitent pour donner une croûte étanche et parfois très épaisse d'évaporites (Boutelli, 2012).

2.3 Caractéristiques des sebkhas

2.3.1 Flore végétale

L'identification des taxons observés a permis de classer 175 espèces appartenant à 127 genres et 39 familles. Parmi les familles citées, quatre sont dominantes notamment les *Asteraceae* (33 espèces), les *Poaceae* (29 espèces), les *Amaranthaceae* (14 espèces) et les *Fabaceae* (11 espèces), et d'autres familles non dominantes y compris les *Caryophyllaceae* (09 espèces), les *Plumbaginaceae* (07 espèces), les *Geraniaceae* (06 espèces), les *Brassicaceae* (05 espèces), etc. (Figure 05). Il est important de signaler que les cultures céréalières (blé dur, blé tendre et orge) dominant de loin les champs entourant le plan d'eau de la Sebkhass (Bahi et al., 2020).

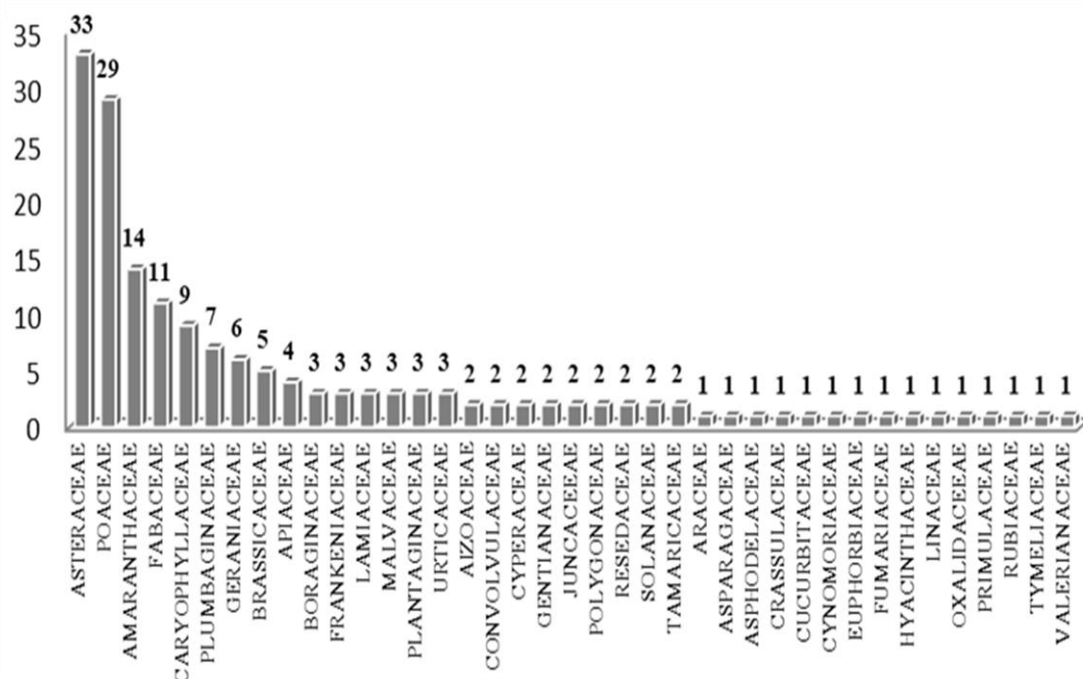


Figure 05: Famille des plantes présentes dans une Sebka d'Oran (Bahi et al., 2020).

2.3.2 Faune

La Sebka semble être le lieu privilégié des espèces migratrices venant de Gibraltar à l’Ouest. C’est notamment le cas des limicoles, des grues et des flamants roses qui affectionnent particulièrement les zones humides et de très faible profondeur. La présence de flamants roses et de tadornes de Belon est particulièrement nichée sur la Sebka (Zeghoud, 2020).

2.3.3 Microorganismes

Les microorganismes d’une Sebka sont représentés par des procaryotes, quelques protozoaires, des algues microscopiques et des champignons (Wild, 1993 ; Miaer et al., 2000) (Tableau 01).

Tableau 01 : Principaux taxons de microorganismes dans une Sebka (Roger et al., 2011).

Grands groupes	Taxons considérés comme important dans la sebka
Procaryotes photosynthétiques	Cyanobactéries, Bactéries pourpres et vertes
Champignons	Moisissures à plasmodium
Algues	Algues vertes, Eugléniens, Diatomées
Protozoaires	Amibes, Testacés, Ciliés

2.4 Exploitation et application des sebkhas

Les Sebchas constituent l’une des zones humides les plus désirées dans le sahel, subissant différentes formes de dégradations et de transformations, mais présentant en même temps des potentiels de développement durable intéressant à exploiter (Landolsi et Rejeb, 2014). Même

si ces milieux sont très utiles et très exploités, ils sont soumis à de nombreux problèmes. Ils reçoivent des effluents d'eaux usées industrielles ou ménagères et des eaux de ruissellements chargées en engrais agricoles et en polluants organiques et même inorganiques qui augmentent la teneur en matière organique et des nutriments surtout le phosphore et l'azote (Thiam et *al.*, 2015). Ceci entraîne une modification des qualités physico-chimiques et microbiologique de l'eau, en particulier la réduction de l'oxygène dissout qui génère un environnement anoxique favorisant le phénomène d'eutrophisation (Aibeche et *al.*, 2020).

Ces milieux sont également une source importante de microflore, est un indice de prolifération phytoplanctonique important en périodes plus humides, et par la suite une réserve trophique favorable aux oiseaux migrateurs et nicheurs (Sabai et *al.*, 2015). D'autre part, ils pourraient constituer, dans un avenir proche, des sites potentiels pour l'aquaculture saharienne, à savoir l'élevage de la crevette, notamment la crevette de saumure *Penaeus vannamei*, qui tolère une forte teneur en sel (Gouasmia et *al.*, 2016). En effet, ces bassins sont une source remarquable qui héberge des microorganismes, tels que les microalgues halophiles. Parmi les espèces les plus répandues, *Dunaliella salina*, membre des Chlorophycées, qui a la capacité de survivre jusqu'à 23 % de sel (Boetius et Joye, 2009).

Ces milieux sont également caractérisés par le développement des bactéries halophiles et aussi des archées halophiles, qui sont exploitées pour leurs potentiels biotechnologiques comme la récupération des caroténoïdes et des différents pigments tels que la rhodopsine qui donne aux milieux qu'ils occupent la couleur rouge, ainsi que la production de différentes enzymes (cellulases, pectinases, DNases, etc.) (Benziane, 2014). Des extractions de sel sont également réalisées à partir de ces milieux ; l'ENASEL (Entreprise Nationale des Sels) qui est le plus grand opérateur algérien dans la production et la commercialisation du sel alimentaire et industriel, exploite la rive Ouest de la Sebkhia d'Oran (Moali et Remicgi, 2009).



**Matériel et
méthodes**

- **Cadre de l'étude**

Notre étude expérimentale a été réalisée au sein du laboratoire pédagogique de Microbiologie de l'Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou (UMMTO) durant la période de Juin à Juillet. Les différentes analyses des paramètres physico-chimiques du sol ont été effectuées au niveau du laboratoire QUAR.TECH de Tizi-Ouzou, spécialisé dans l'étude des sols agricoles.

L'objectif principal de ce travail, est l'isolement et la caractérisation de souches bactériennes halotolérantes, à partir d'un sol d'une Sebkhha située au Nord-Ouest algérien.

- **Echantillonnage du sol**

L'échantillon de sol de la sebkha, située dans le Nord-Ouest algérien, a été prélevé dans un flacon stérile durant le mois d'Avril, puis conservé à température ambiante à l'abri de la lumière et de la chaleur jusqu'à l'analyse.

1. Matériel

L'ensemble des appareillages, matériel, verrerie, réactifs chimiques utilisés sont cités dans l'Annexe 01.

2. Méthodes

2.1 Analyse pédologique du sol

Une quantité de sol a été prélevé et préparé pour l'analyse pédologique. De grosses mottes ont été brisées manuellement et le sol a été mis à sécher au préalable (air ambiant) pendant une semaine et à l'abri de la poussière. Après séchage, les agrégats ont été réduits à l'aide d'un mortier. L'échantillon de sol séché a été tamisé à 2 mm et toutes les analyses ont été réalisées sur la terre fine uniquement.

Au total, quatorze paramètres ont été déterminés pour notre échantillon de sol : pH, conductivité électrique (CE), Carbonate (CO_3^{2-}), Bicarbonate (HCO_3^-), Matière Organique (MO %), Carbone organique (CO %), Calcaire total (Ca %), Calcaire actif (Ca %), Azote total (N %), éléments minéraux (meq/100 g) (NaCl, S_2SO_4 , Cl), phosphore total (ppm), et granulométrie du sol (%).

2.1.1 Analyse physique

2.1.1.1 Analyse granulométrique

a. Principe

L'analyse granulométrique consiste à séparer un sol selon des caractéristiques comme le poids et la taille, afin de déterminer la nature du sol (sableux, limoneux, calcaire ou argileux), en utilisant la méthode de tamisage, qui consiste à fractionner au moyen d'une série de tamis en plusieurs dimensions de maille entre 02 mm jusqu'à 20 mm.

b. Méthode

Avant de commencer le tamisage, l'échantillon doit être pesé afin de connaître le poids initial. Les tamis sont emboîtés les uns sur les autres, de façon à ce que la progression des ouvertures soit croissante du bas vers le haut. Dans la partie inférieure, un fond a été placé afin de récupérer la poussière pour des analyses complémentaires.

c. Lecture

Il existe cinq classes granulaires principales caractérisées par les dimensions extrêmes d et D des granulats rencontrées selon les normes de Mishellan et al. (1998) (Tableau 02).

d est le diamètre minimum des grains, et D est le diamètre maximum des grains. Lorsque d est inférieur à 0.5 mm, le granulat est désigné 0/D.

Tableau 02: Classe granulaire.

Norme	Interprétation
0 / D avec $D < 0.08$ mm	Les fines
0 / D avec $D < 6.3$ mm	Les sables
d / D avec $d > 2$ mm et $D < 31.5$ mm	Les gravillons
d / D avec $d > 20$ mm et $D < 80$ mm	Les cailloux
d / D avec $d > 6.3$ mm et $D < 80$ mm	Les graves

2.1.2 Analyse physico-chimique

2.1.2.1 Mesure du pH

a. Principe

Le pH est un coefficient qui caractérise l'acidité ou la basicité d'un sol. Il définit la concentration d'ions H^+ dans la phase liquide du sol. Le pH varie de 0 à 14 et la neutralité est atteinte lorsque le pH est égal à 7.

b. Méthode

Dix grammes de sol ont été ajoutés à 25 mL d'eau distillée dans un bécher de 100 mL. Le mélange a été ensuite agité pendant 15 min avec un agitateur magnétique, puis laissé au repos pendant 15 min, afin de mesurer le pH à l'aide d'un pH-mètre.

c. Lecture

La détermination de la gamme de pH a été faite selon les normes de la première version du référentiel pédologique Française de Baize (1988) (Tableau 03).

Tableau 03: Classification du sol selon le pH.

Norme	Interprétation
pH inférieur à 3.5	Hyper-acide
pH entre 3.5 et 5	Très acide
pH entre 5 et 6.5	Acide
pH entre 6.5 et 7.5	Neutre
pH entre 7.5 et 8.7	Basique
pH supérieur à 8.7	Très basique

2.1.2.2 Mesure de la conductivité électrique

a. Principe

La conductivité électrique (CE) d'un sol est la mesure de la quantité d'ions présents dans un sol donné, et qui pourraient se dissoudre en présence d'eau. Cette méthode permet de déterminer la salinité dans les sols.

b. Méthode

Dix grammes de sol ont été ajoutés à 50 mL d'eau distillée dans un bécher de 100 mL, suivi d'une agitation pendant 15 min avec un agitateur magnétique. Après un repos de 15 min, la CE a été mesurée à l'aide d'un conductivimètre.

c. Lecture

La détermination de la CE a été faite selon les normes d'Aubert (1978) (Tableau 04).

Tableau 04: Niveau de conductivité électronique des sols.

Norme	Interprétation
De 0 à 3	Non salé
De 3 à 6	Légèrement salé
6	Salin
De 6 à 20	Très salé
De 20 à 30	Extrêmement salé

2.1.2.3 Mesure de la teneur en matière organique

a. Principe

Afin de déterminer la composition du sol en organismes vivants, résidus végétaux et résidus animaux, ainsi que les produits de décomposition, en utilisant la méthode de Walkley et Black, (1977) est utilisée. Cette dernière consiste à réaliser un titrage à base d'une solution de FeSO_4 comme solution titrante, et la solution à titrer contenant un indicateur à la diphenylamine.

b. Méthode

Un gramme de terre fine a été pesé à l'aide d'une balance, puis déposé dans un ballon en pyrex d'une contenance de 500 mL. A l'aide d'une pipette avec poire, 10 mL de $K_2Cr_2O_7$ ont été ajoutés, ainsi que 20 mL de H_2SO_4 à l'aide d'une éprouvette. L'agitation a été faite avec précaution afin d'éviter les réactions dangereuses, en maintenant le ballon loin du visage. Le mélange a été ensuite refroidi au réfrigérateur pendant environ 30 min.

Une fois que le mélange a été refroidi, 150 mL d'eau distillée et 10 mL d'acide phosphorique ont été ajoutés doucement. Un millilitre d'indicateur à la diphénylamine a été ajouté au mélange bien homogène (solution A). Une fois que notre solution « A » est prête, une opération de titrage est nécessaire. Cette opération se fait comme suit :

- Mettre dans un bécher la solution à titrer, soit la solution « A », et dans la burette la solution titrante, soit la solution $FeSO_4$.
- Réaliser un test témoin dans les mêmes conditions mais sans l'échantillon, afin d'avoir une matrice de comparaison (Figure 06).

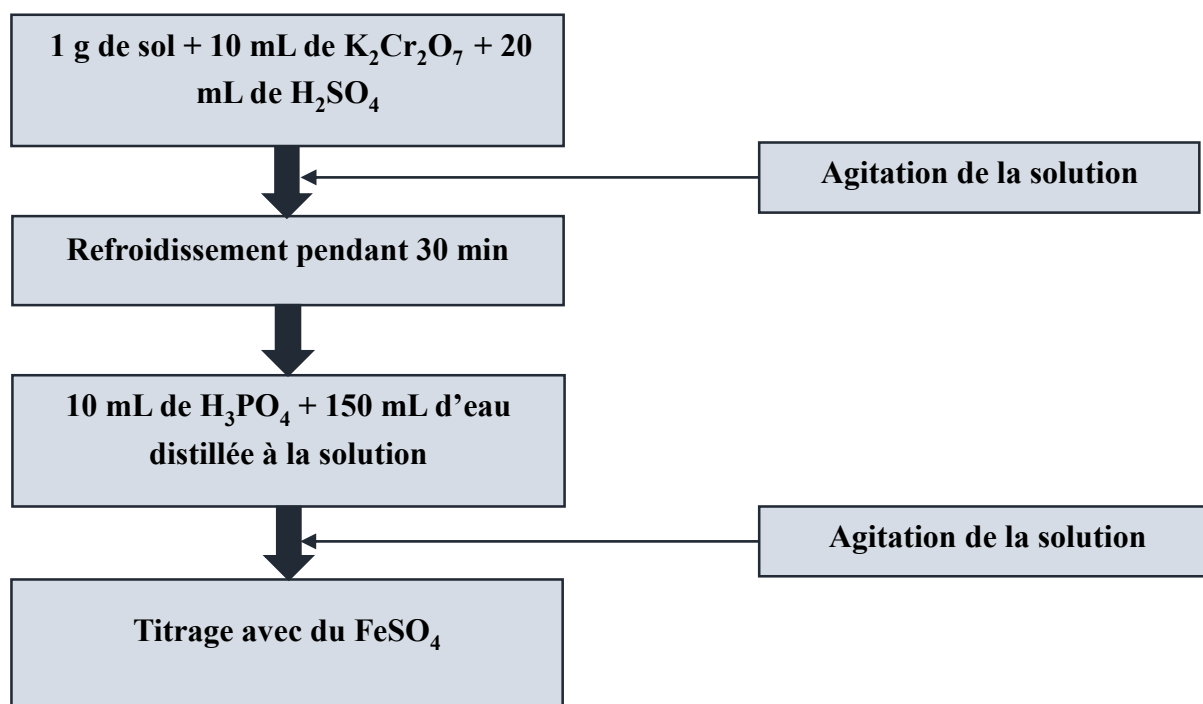


Figure 06 : Dosage de la matière organique dans le sol.

c. Lecture

La lecture se fait une fois que la solution à titrer change de couleur et après l'obtention d'une couleur verte brillante. La mesure du volume de la solution consommée soit la solution « B » est nécessaire, et cela se fait grâce à la loi ci-dessous.

$$C.O (\%) = 4 (A - B) / A$$

$$M.O (\%) = C.O \times 1.72$$

Les normes d'interprétation selon Arrouays et Webb, (2003) sont présentés dans le tableau 05.

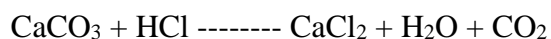
Tableau 05 : Norme d'interprétation pour la matière organique.

Norme	Interprétation
> 1	Très pauvre
1 – 2	Pauvre
2 – 4	Moyen
4 <	Riche

2.1.2.4 Dosage du calcaire total et actif

a. Principe

Ce test permet de mettre en évidence une méthode gazométrique qui permet de distinguer qu'une mole de CaCO_3 permet le dégagement d'une mole de gaz carbonique en utilisant du HCl, selon la réaction suivante :



b. Méthode

- Calcaire actif

Dans un flacon de 25 mL contenant 100 mL de la solution d'oxalate d'ammonium, 1 g de terre fine a été ajouté, puis le tout a été mélangé pendant 2 h à l'aide d'un agitateur magnétique. Une fois que l'agitation est faite, la solution a été filtrée dans un bécher et les premiers millilitres du filtrat ont été repris afin de réaliser une deuxième filtration.

A l'aide d'une pipette, 20 mL de la solution d'extraction ont été prélevés, puis versés dans un bécher de 250 mL dans lequel 5 mL d'eau distillée ainsi que 5 mL d' H_2SO_4 concentré ont été ajoutés. Le mélange a été ensuite chauffé environ 2 h à une température comprise entre 60 °C et 80 °C, afin d'obtenir la solution « A ».

Après le chauffage, une étape de titrage a été faite, en utilisant la solution de permanganate comme solution titrante et la solution « A » comme solution à titrer. Un test témoin a été réalisé dans les mêmes conditions mais sans l'échantillon, afin d'avoir une matrice de comparaison (Figure 07).

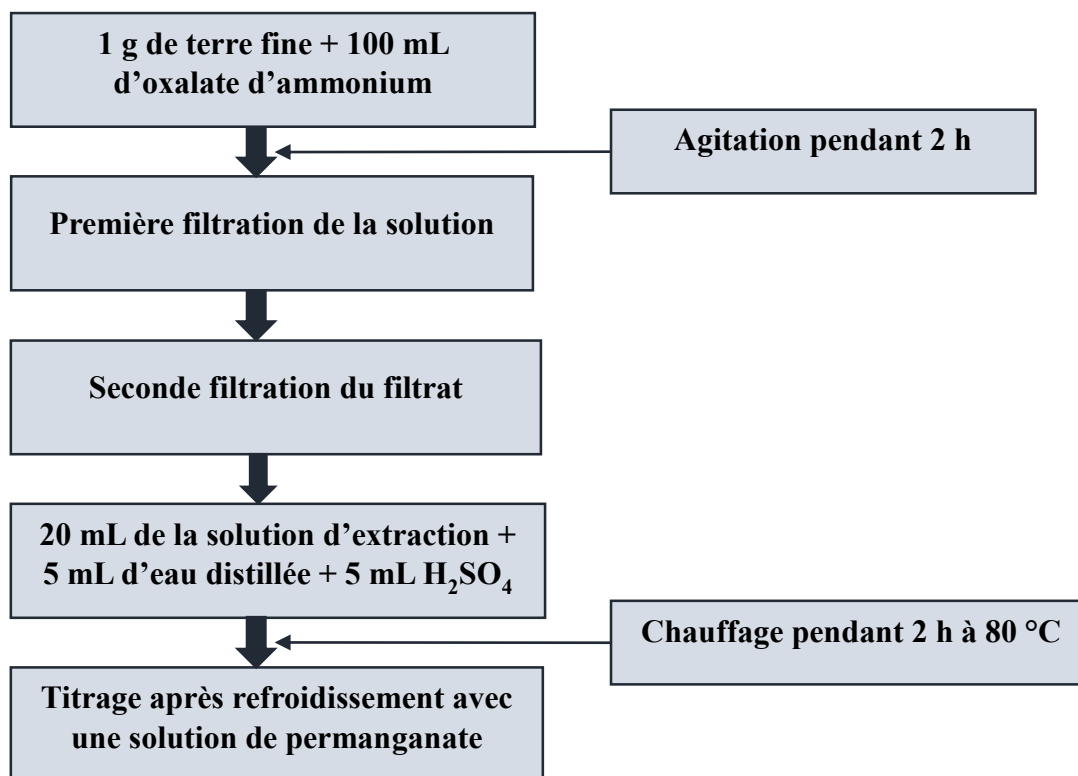


Figure 07 : Dosage du calcaire actif.

- **Calcaire total**

Dans un erlenmeyer, 1g de terre fine de notre échantillon a été déposé pour une contenance de calcaire actif entre 20 % à 39.9 % de CaCO_3 . Un tube contenant du HCl a été mis dans l'erlenmeyer de manière verticale afin de ne pas verser sur la prise. L'erlenmeyer a été ensuite bouché soigneusement.

L'erlenmeyer a été relié à un calcimètre, puis l'équilibre des pressions a été fait en ramenant au zéro de la colonne le niveau d'eau de l'ampoule par le dispositif prévu, afin de pouvoir verser l'acide contenu dans le tube sur la prise d'essai en inclinant l'erlenmeyer et en agitant énergiquement en tenant l'erlenmeyer par le col afin d'éviter tout échauffement. Le suivi a été fait en assurant un équilibre permanent du niveau d'eau que ce soit pour la colonne ou pour celui de l'ampoule, afin de pouvoir noter le volume V_1 après stabilisation du volume de gaz dégagé. Un test témoin a été réalisé dans les mêmes conditions mais avec une prise de 0.2 g de CaCO_3 , afin d'avoir une matrice de comparaison. Le volume V_2 a été également noté par la suite.

c. Lecture

La mesure du volume de la solution consommée est nécessaire, et cela se fait grâce à la loi suivante :

- **Pour le calcaire actif**

$$\text{CaCO}_3 (\%) = 5 \times (\text{N} - \text{n})$$

Soit :

N : Nombre de mL KMnO_4 utilisés du témoin
 n : Nombre de mL KMnO_4 utilisés de l'échantillon

- **Pour le calcaire total**

$$\text{CaCO}_3 (\%) = (\text{V1} \times 0.2 \times 100) / (\text{P} \times \text{V2}) = (\text{V1} \times 20) / (\text{P} \times \text{V2})$$

Soit :

V1 : Lecture du volume d'échantillon
 V2 : Lecture du volume pour le témoin
 P : Poids de la terre fine utilisée
 0.2 : Poids du CaCO_3 pour le témoin

Les normes d'interprétations selon Baize (1988) sont présentées dans le tableau 06.

Tableau 06 : Classification des sols selon le pourcentage de calcaire (CaCO_3).

Norme	Interprétation
De 0 à 5	Peu calcaire
De 5 à 15	Moyennement calcaire
De 15 à 30	Calcaire
> 30	Très calcaire

2.1.2.5 Dosage du phosphore assimilable

a. Principe

Cette analyse permet de contrôler le taux ainsi que la réserve de la matière phosphatée dans un sol et de déterminer les ratios de phosphore à effectuer pour la végétation présente dans ce dernier.

b. Méthode

Afin de pouvoir déterminer la concentration de phosphore présente dans notre échantillon de sol, une étape d'extraction suivie d'une étape de dosage est nécessaire (Figure 08).

- Extraction

Quatre grammes de terre ont été versés dans un flacon dans lequel a été ajouté 100 mL d'oxalate d'ammonium. A l'aide d'un agitateur magnétique, la solution a été agitée pendant 2 h. Au final, la solution a été filtrée à l'aide d'un papier filtre, afin d'obtenir la solution « A ».

- Dosage

Un volume de 1.5 mL de la solution « A » a été versé dans un flacon stérile comme solution de prise d'essai, puis 2 mL de réactif sulfomolybdique et 6.5 mL de solution d'acide ascorbique ont été ajoutés par la suite. Le mélange a été homogénéisé puis placé dans un bain-marie pendant 10 à 12 min à une température entre 80 °C et 100 °C, afin de bien chauffer la solution. Une fois que la solution a été chauffée, cette dernière a été refroidie à une température ambiante.

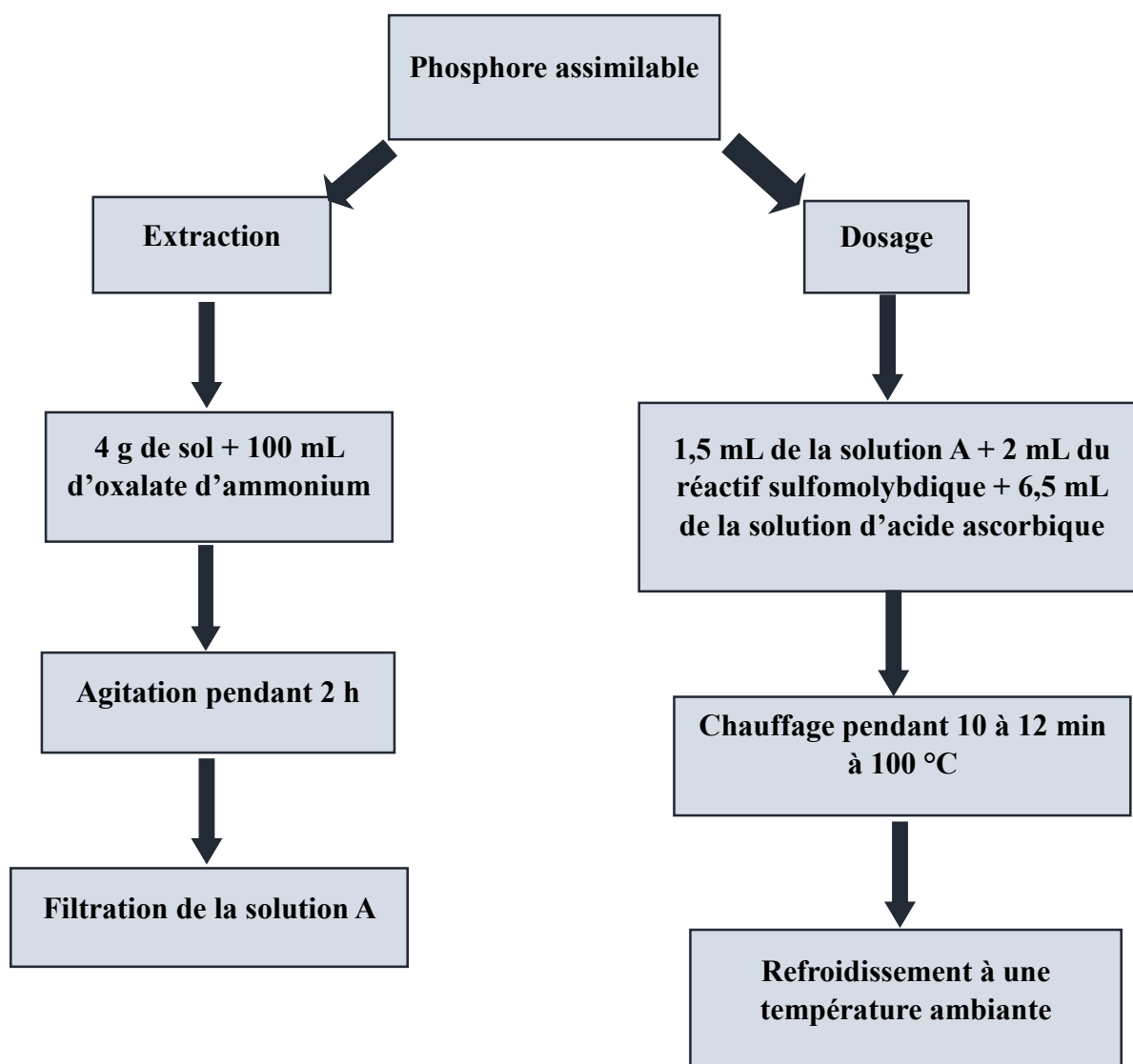


Figure 08 : Dosage du phosphore.

c. Lecture

La lecture se fait au passage d'un extrait de la solution au spectromètre à une longueur d'onde de 825 nm. Selon la loi ci-dessous, le taux de phosphore dans le sol a été déterminé.

$$\mathbf{P_2O_5 \text{ (ppm)} = X \times U \times V / P \times v = (X / 6) \times 1000}$$

Soit :

X : Concentration lue sur le spectromètre
 U : Volume de solution utilisée
 v : Volume de la prise d'essai
 V : Volume de la solution d'extraction
 P : Poids de la prise d'essai

Les normes d'interprétation selon Calviet et Villemin, (1986) sont présentées dans le tableau 07.

Tableau 07 : Normes d'interprétation pour le phosphore assimilable.

Norme	Interprétation
< 30 ppm	Très faible
30 – 50 ppm	Pauvre
50 – 100 ppm	Moyennement pauvre
100 – 200 ppm	Riche

2.1.2.6 Dosage de l'azote total

a. Principe

Cette méthode est basée sur la distillation en milieu basique de l'azote et la récupération de la solution formée dans l'H₂SO₄, suivi d'un dosage par l'acide sulfurique en présence de l'indicateur coloré mixte.

b. Méthode

Le dosage de l'azote dans notre échantillon de sol se déroule en deux étapes (Figure 09).

- Minéralisation

Cinq grammes de terre fine ont été passés au tamis à maille de 2 mm, afin de pouvoir l'introduire dans un matras de Kjeldhal de 500 mL. Un gramme de catalyseur et 20 mL d'H₂SO₄ concentré ont été ajoutés. La solution a été ensuite homogénéisée par agitation manuelle sous une hôte bien ventilée.

La solution a été chauffée d'abord à feu doux ; puis à feu vif jusqu'à l'obtention d'un liquide incolore. Cette opération peut demander plusieurs heures. Une fois l'obtention d'une solution

incolore, le chauffage se poursuit encore 15 min à 30 min après la décoloration. La solution a été refroidie puis récupérée dans une fiole jaugée de 100 mL. Un ajustement avec de l'eau distillée jusqu'à 100 mL est nécessaire.

- Distillation

Vingt millilitres de la solution contenue dans la fiole ont été prélevés pour la distillation, et récupérés dans un matras. Trente millilitres de NaOH (6 N) ont été ajoutés et distillés en recueillant le distillat dans un bécher qui contient 10 mL d'acide borique (2 %) et un indicateur coloré mixte. Cette solution représente la solution « n ». Une méthode de titrage a été réalisée, en utilisant l'acide sulfurique (0.1 N) comme élément titrant. Un témoin a été réalisé avec la même méthode mais sans sol (minéralisation + distillation).

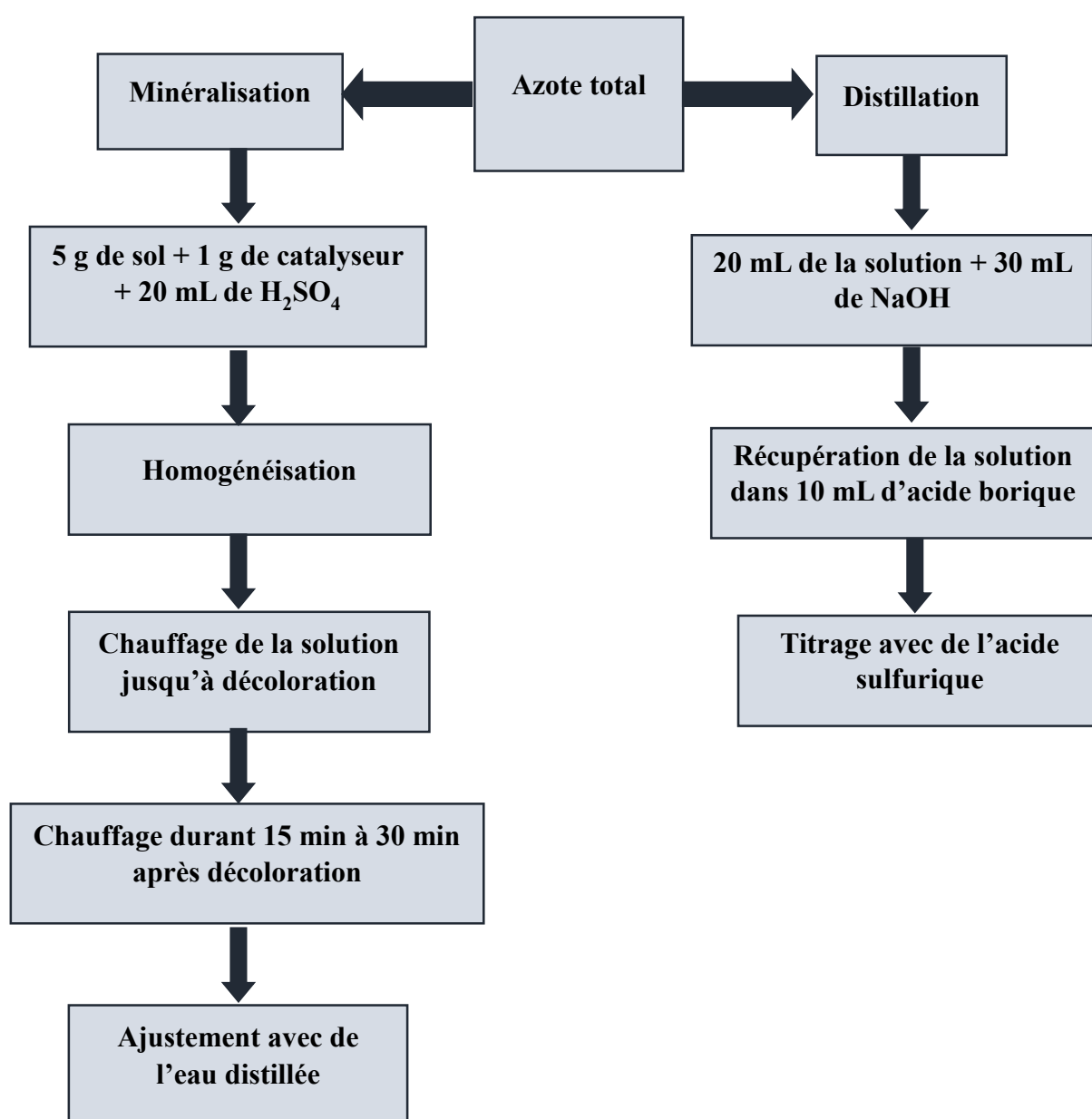


Figure 09 : Dosage de l'azote.

c. Lecture

La détermination du taux d'azote se fait selon la loi ci-dessous.

$$N \% = (n - n') \times 0.05 \times 1.4 / p$$

Soit :

n : Volume de l'échantillon (lue sur la burette).
 n' : Volume de témoin (lue sur la burette).
 V : Volume de la solution d'extraction (100ml).
 V' : Volume prélevé pour la distillation.
 P : Poids du sol (5g).

Le tableau 08 présente les normes d'interprétation selon Calviet et Villemin, (1986).

Tableau 08 : Norme d'interprétation pour l'azote.

Norme	Interprétation
N < 0.05%	Sol très pauvre
0.05% > N > 0.1%	Sol pauvre
0.1% > N > 0.15	Sol moyen
0.15% > N > 0.25%	Sol riche
0.25% > N	Sol très riche

2.1.2.7 Dosage des Sulfates (SO₄²⁻)

a. Principe

Le dosage des sulfates a pour but de déterminer s'il est présent dans le sol, ainsi que son origine naturel (gypse).

b. Méthode

Dans un bécher dans lequel 10 g de sol ont été versés, 50 mL d'eau distillée et 1 mL d'HCl et 2 à 3 gouttes de méthyle orange ont été ajoutés. Le bécher a été placé sur une plaque chauffante jusqu'à ébullition, avant d'ajouter 10 mL de BaCl₂. Après 5 à 10 min d'ébullition, le bécher a été recouvert d'un verre de montre, afin de laisser le temps au SO₄ de précipiter sous forme de BaSO₄.

Après refroidissement, la solution a été filtrée sous un filtre qui a été ensuite placé dans des capsules en porcelaine sèches et tarées. Ces dernières ont été ensuite placées dans un four réglé à 550 °C pendant 3 à 4 h. Une fois sorties du four, les capsules ont été placées dans un dessiccateur pour refroidir. Après refroidissement, la pesée se fait à l'aide d'une balance analytique (Figure 10).

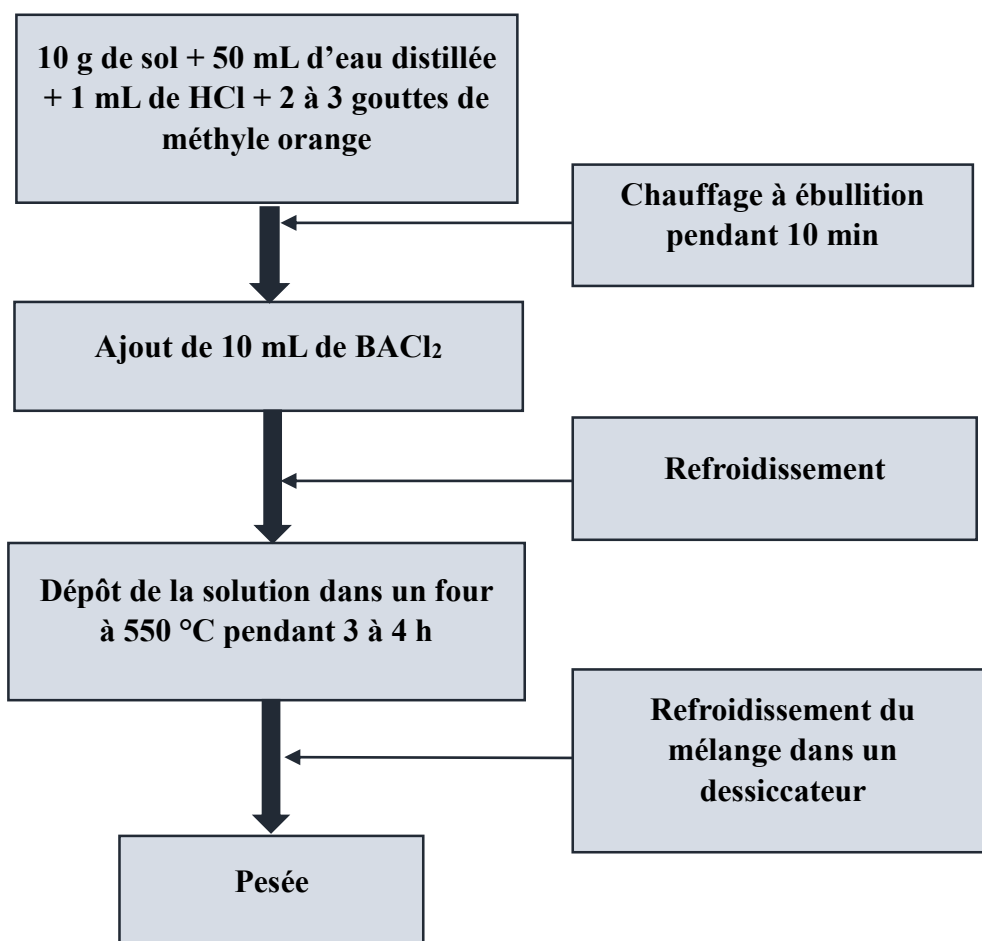


Figure 10 : Dosage des sulfates.

c. Lecture

Afin de pouvoir estimer le taux de sulfate dans notre échantillon, la loi suivante a été utilisée :

$$SO_4 \text{ (meq / l)} = t - b / v \times 8583.7$$

Soit :

t : Poids de la capsule plus le $BaSO_4$ précipité (g)
 B : Poids de la capsule (g)
 V : Volume de l'extrait (ml)

Le tableau 09 présente les normes d'interprétation mondiale pour le sulfate selon Olsen (1985).

Tableau 09 : Norme d'interprétation pour le dosage des sulfates.

Norme	Interprétation
0 – 5	Très basse
5 – 10	Basse
10 – 22	Moyen
> 22	Elevé

2.1.2.8 Dosage des chlorures

a. Principe

Ce dosage a pour but de réaliser un titrage des ions chlorure Cl^- par les ions argent Ag^+ , afin de pouvoir déterminer la chlorinité d'un sol et donc de calculer sa salinité.

b. Méthode

Dans un erlenmeyer de 250 cm^3 , 5 cm^3 de l'échantillon ont été versés, puis 3 gouttes de chromate de potassium ont été ajoutés afin de réaliser le titrage avec le nitrate d'argent jusqu'au chargement de la couleur du vert au rouge brique.

Un témoin de chlorure de sodium a été réalisé pour déterminer la normalité de AgNO_3 exactement tout en mettant 5 cm^3 de chlorure de sodium (0.01 N) dans l'erlenmeyer. Trois gouttes de l'indicateur de chromate de potassium ont été ajoutées, puis une étape de titrage a été réalisée avec le nitrate d'argent.

Si on suppose que pour 5 cm^3 de chlorure de sodium, il faut 5.2 cm^3 de nitrate d'argent, la normalité du nitrate d'argent est :

$$5 \times 0.01 = 5.2 \times X.$$

$$X = 0.01 \times 5 / 5.2 = 0.0096.$$

c. Lecture

Le taux du chlorure dans le sol se mesure par la loi suivante :

$$\text{Cl (meq/l)} = V1 \times N \text{ AgNO}_3 \times 1000 / V2$$

Soit :

V1 : Volume d' AgNO_3 qui a réagi

V2 : Volume de la prise d'essai

N : Normalité d' AgNO_3

2.1.2.9 Dosage des carbonates et des bicarbonates (CO_3^{2-} et HCO_3^-)

a. Principe

Cela consiste à déterminer la présence des carbonates et des bicarbonates dans notre échantillon de sol, afin de pouvoir déterminer le taux de risque de former des complexes avec le calcium et le magnésium (soit le carbonate de calcium ou le carbonate de magnésium), s'ils sont présents dans le milieu, dans les conditions de sécheresse.

b. Méthode

- Détection des carbonates

Dans une fiole jaugée d'une contenance de 250 cm^3 , 10 cm^3 d'extrait filtré de sol ont été ajoutés ainsi que 4 à 5 gouttes de la phénolphthaléine ont été ajoutées par la suite. Après une agitation manuelle afin d'obtenir un virage de couleur du milieu au rose clair, témoin d'une présence des carbonates. Cette solution constitue la solution « A ». Si la couleur rose n'apparaît pas, l'échantillon ne contient pas de carbonates, l'étape du titrage n'est donc pas nécessaire, alors le dosage des bicarbonates peut être réalisé directement.

Par la suite, l'étape de titrage est réalisée afin de déterminer la concentration des carbonates dans le milieu. Cette étape se fait comme suit :

- Utilisation d'une solution d'acide sulfurique comme solution titrante avec la solution « A » comme solution à titrer, ainsi que le volume de la solution titrante a été noté volume « Y » et le volume de la solution à titrer a été noté volume « X ».
- Réalisation d'un test témoin dans les mêmes conditions mais sans l'échantillon, afin d'avoir une matrice de comparaison (Figure 11).

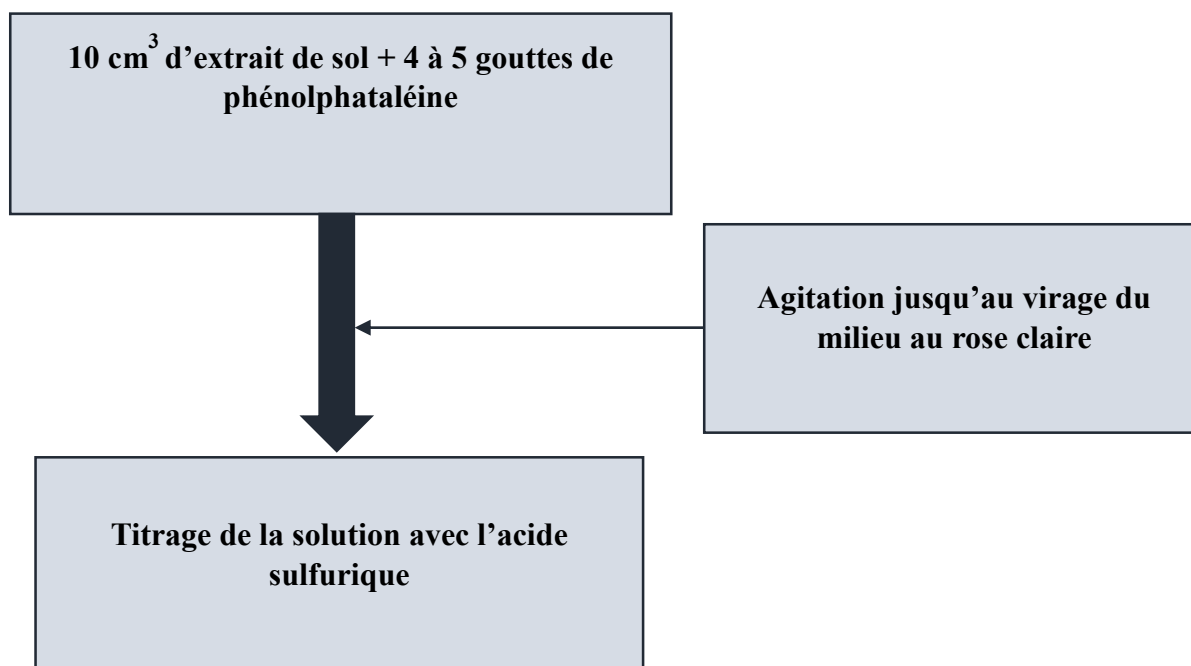


Figure 11 : Dosage des carbonates.

- Détection des bicarbonates

Dans une fiole jaugée d'une contenance de 250 cm³, 10 cm³ d'extrait filtré de sol ont été ajoutés, suivi de 4 à 5 gouttes de méthyle orange. Le tout est mélangé manuellement pour l'obtention de la solution « A ». L'étape de titrage a été ensuite réalisée afin de déterminer la concentration des bicarbonates dans le milieu, et cette étape se fait comme suit :

- Utilisation d'une solution d'acide sulfurique comme solution titrante avec la solution « A » comme solution à titrer, ainsi que le volume de la solution titrante a été noté volume « Y » et le volume de la solution à titrer a été noté volume « X ».
- Réalisation d'un test témoin dans les mêmes conditions mais sans l'échantillon, afin d'avoir une matrice de comparaison (Figure 12).

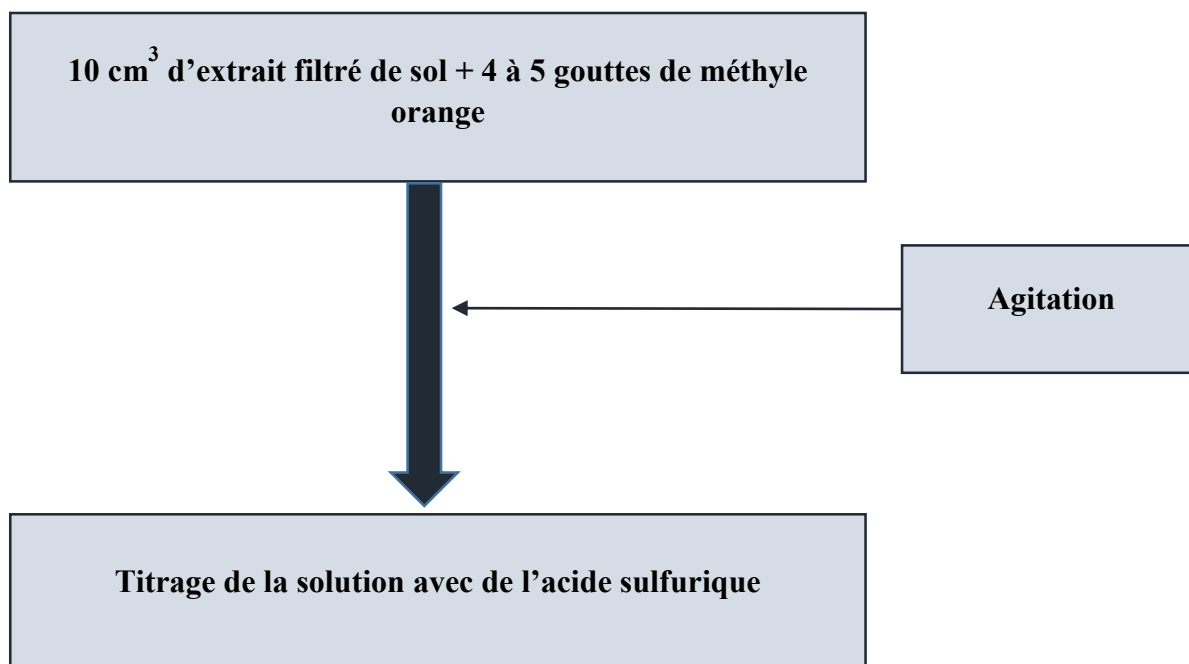


Figure 12 : Dosage des bicarbonates.

c. Lecture

Le titrage a été réalisé jusqu'à disparition de la coloration rose du milieu pour déterminer la présence des carbonates. Le titrage a été fait afin d'avoir la coloration orange du milieu, témoin d'une présence des bicarbonates.

La détermination de la concentration des carbonates et des bicarbonates dans notre sol, se fait selon la loi suivante :

$$\text{CO}_3^{2-} \text{ (meq / l)} = 2 X \times 0.02 \times 1000 / 10 = X \times 4$$

$$\text{HCO}_3^- \text{ (meq / l)} = (Y - X) \times 0.02 \times 1000 / 10 = (Y - X) \times 2$$

Le tableau 10 présente les normes d'interprétations des carbonates dans un sol selon Craaq (2003).

Tableau 10 : Norme d'interprétation des carbonates dans un sol.

Norme	Interprétation
Moins de 0	Absence
Entre 0 et 50	Très douce
Entre 50 et 100	Douce
Entre 100 et 200	Modérément douce
Entre 200 et 300	Dure
Entre 300 et plus	Très dure

2.2 Isolement, purification et conservation des souches

2.2.1 Milieux d'isolement

Les milieux utilisés pour l'isolement des souches bactériennes, notamment les actinobactéries, sont le milieu ISP1, le milieu ISP2, le milieu Bennett, le milieu Luria Bertani, la gélose nutritive et le bouillon nutritif (Annexe 02). Le pH de chaque milieu de culture a été vérifié grâce à des bandelettes de pH, puis ajusté si nécessaire. Les boîtes de Pétri contenant les milieux de culture ont été enveloppées dans du papier film transparent ainsi que dans du papier aluminium, puis incubées à 37 °C pendant 24 h, afin de s'assurer que ces boîtes ne présentent aucune contamination. Ces boîtes sont ensuite conservées au réfrigérateur à 4 °C pour une utilisation ultérieure.

2.3 Technique d'ensemencement

La suspension mère a été préparée par le transfert d'un gramme de sol dans un volume de 9 mL d'eau physiologique stérile, ce qui permet l'obtention d'une dilution de 10^{-1} . À partir de cette suspension mère, une série de dilution jusqu'à 10^{-3} a été réalisée. Toutes les suspensions préparées ont été soumises à une agitation vigoureuse au vortex pendant 10 min.

Par la suite, à l'aide d'une pipette Pasteur, 100 μ L de chaque dilution ont été étalés sur des boîtes contenant les milieux ISP1, ISP2, Bennett et Luria Bertani précédemment stérilisés et coulés dans des boîtes de Petri stériles. Deux répétitions au minimum ont été effectuées pour chaque dilution. Les boîtesensemencées ont été incubées à 40 °C pendant 72 h.

En parallèle, un ensemencement a été également réalisé sur les mêmes milieux de culture après la réalisation d'une étape d'enrichissement dans de l'eau peptonnée tamponnée (sans la réalisation de dilutions décimales). Ces boîtes ont été incubées à 30 °C pendant 24 h.

Après incubation, les différentes colonies ont été purifiées par des repiquages successives sur les mêmes milieux d'isolement jusqu'à l'obtention d'isolats purs. La pureté de ces souches bactériennes est confirmée par un examen macroscopique et microscopique. Les souches pures sont numérotées puis repiquées sur le même milieu de culture, puis conservées à 4 °C (Figure 13).

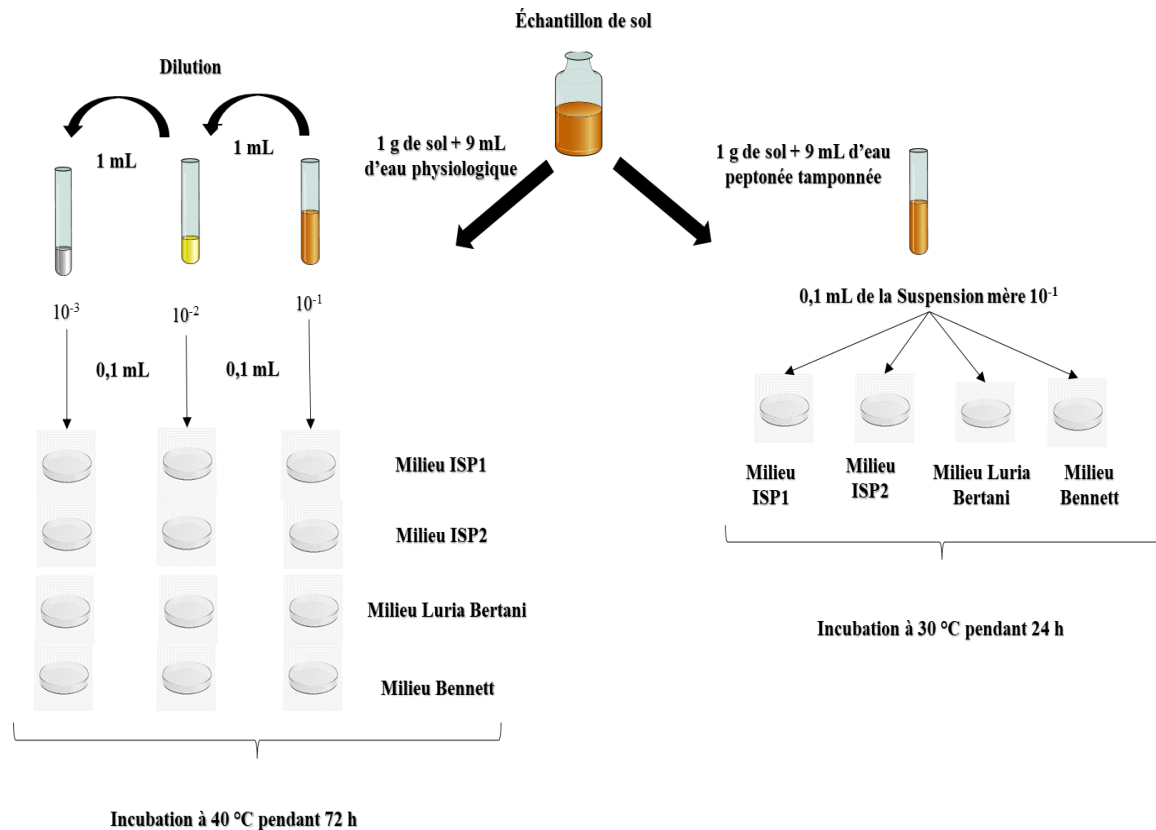


Figure 13 : Différentes étapes de la préparation des dilutions décimales.

2.4 Caractérisation des souches

L'identification des isolats est basée sur la connaissance d'un certain nombre de caractères phénotypiques, biochimiques, enzymatiques et physiologiques.

2.4.1 Etude phénotypique

Cette étude consiste à observer la morphologie de tous les isolats par une observation macroscopique et une observation microscopique.

2.4.1.1 Observation macroscopique

La description macroscopique des colonies bien isolées consiste en une observation des caractères morphologique à l'œil nu. Parfois cette étude à elle seule, permet de connaître le germe qu'on a en présence, du fait que les colonies sont typiques. C'est la première étape qui oriente le processus d'identification des bactéries.

Pour cela, un repiquage a été réalisé, sur les mêmes milieux d'isolement et les différentes souches ont été ensemencées par la technique des trois cadrans en effectuant des stries serrées. Les souches sont ensuite incubées à 30 °C pendant 24 h. L'observation macroscopique des colonies se fait dans la zone d'aseptise devant un bec bunsen, en utilisant une loupe binoculaire.

Les principaux caractères à étudier sont : la forme des colonies (rondes, filamenteuses, irrégulière, etc.), le relief ou autrement dit l'élévation (bombée, plate, convexe, etc.), le contour

ou bien le bord (régulier, lobé, filamenteux, etc.), la taille (en mm), la surface (lisse, rugueuses), la couleur (naturelle par production de pigments, ou par un indicateur de pH), l'opacité (opaques, transparentes, translucides), la consistance (sèche, crémeuses, muqueuses) et il arrive que l'odeur soit significative de l'espèce microbienne en présence.

2.4.1.2 Observation microscopique

➤ Principe

L'étude microscopique a été réalisée après une coloration de Gram, qui est la coloration de base de la bactériologie. Ce type de coloration permet de séparer les bactéries en deux grands groupes : les bactéries Gram positives et les bactéries Gram négatives, grâce à la présence d'une affinité entre les colorants et la structure de la paroi. L'observation microscopique permet aussi de distinguer la forme et l'agencement et le regroupement des cellules bactériennes.

➤ Méthode

Des frottis ont été réalisés en prélevant une colonie à l'aide d'une pipette pasteur. La colonie a été étalée sur une lame de verre propre et préalablement dégraissée contenant une goutte d'eau distillée. Le frottis a été ensuite fixé à la chaleur. La coloration de Gram a été réalisée comme suit :

- Déposer quelques gouttes de solution de violet de Gentiane (colorant basique) sur le frottis fixé et laisser agir 1 minute.
- Rincer très brièvement en faisant couler de l'eau sur la lame au-dessus du frottis.
- Déposer quelques gouttes de lugol sur le frottis et laisser agir 45 secondes.
- Remettre du lugol. Laisser agir 45 secondes et rincer brièvement à l'eau.
- Verser goutte à goutte l'alcool sur la lame inclinée obliquement (5 à 10 secondes).
- Rincer à l'eau.
- Contre-colorer en déposant la solution de Fuschine pendant 1 minute.
- Rincer à l'eau.
- Laisser sécher à l'air et rincer brièvement à l'eau.
- Observer au microscope (au grossissement x1000 en ajoutant de l'huile à immersion).

➤ Lecture

Les bactéries Gram + vont apparaître violettes alors que les Gram- seront colorées en roses.

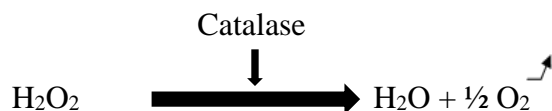
2.4.2 Etude des caractères biochimiques

L'étude des caractères biochimiques permet l'identification des bactéries isolées et purifiées. L'ensemble des résultats obtenus permettent de définir le profil métabolique de la bactérie analysée. Ces tests comprennent le test oxydase, le test catalase, et une galerie biochimique classique.

2.4.2.1 Test catalase

➤ Principe

La catalase est une enzyme présente chez la plupart des bactéries aérobies strictes et aéro-anaérobies facultatives. Le test catalase sert à démontrer si les souches bactériennes possèdent l'enzyme catalase servant à décomposer le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en eau et O_2 comme accepteur d'électrons, selon la réaction suivante :



➤ Méthode

Sur une lame propre, une colonie prélevée à l'anse a été déposée. Une goutte d'eau oxygénée a été ensuite ajoutée.

➤ Lecture

La formation de bulles d'oxygène indique que l' H_2O_2 est dégradé en H_2O et en O_2 , ce qui signifie que la bactérie possède une catalase.

2.4.2.2 Test oxydase

➤ Principe

L'oxydase est une enzyme qui catalyse une réaction d'oxydoréduction impliquant une molécule de dioxygène (O_2) comme accepteur d'électrons.

➤ Méthode

La mise en évidence de l'oxydase a été faite selon la méthode des disques d'oxydase qui consiste à déposer dans un tube contenant la suspension bactérienne, un disque imprégné de PDA (N-diméthyl-paraphénylène diamine).

➤ Lecture

Le test positif se traduit par l'apparition d'une coloration rose violacée, la souche est donc oxydase (+).

2.4.2.3 Galerie biochimique classique

a. Recherche de la nitrate réductase

➤ Principe

Le bouillon nitraté est un milieu liquide qui permet de mettre en évidence l'enzyme du métabolisme énergétique : la nitrate réductase qui réduit le nitrate NO_3 en nitrite NO_2 jusqu'au stade diazote N_2 (gazeux).

➤ Méthode

Un tube de bouillon nitraté a été ensemencé avec une colonie bactérienne d'une culture jeune de 24 h, puis incubé pendant 24 à 48 h à 30 °C ou 40 °C selon les souches.

➤ Lecture

La révélation s'est faite en ajoutant trois gouttes du réactif NR1 et du réactif NR2. La coloration rouge signifie que les deux réactifs ont réagi avec les nitrites, la bactérie a donc réduit les nitrates en nitrites. La souche possède la nitrate réductase (Figure 14).

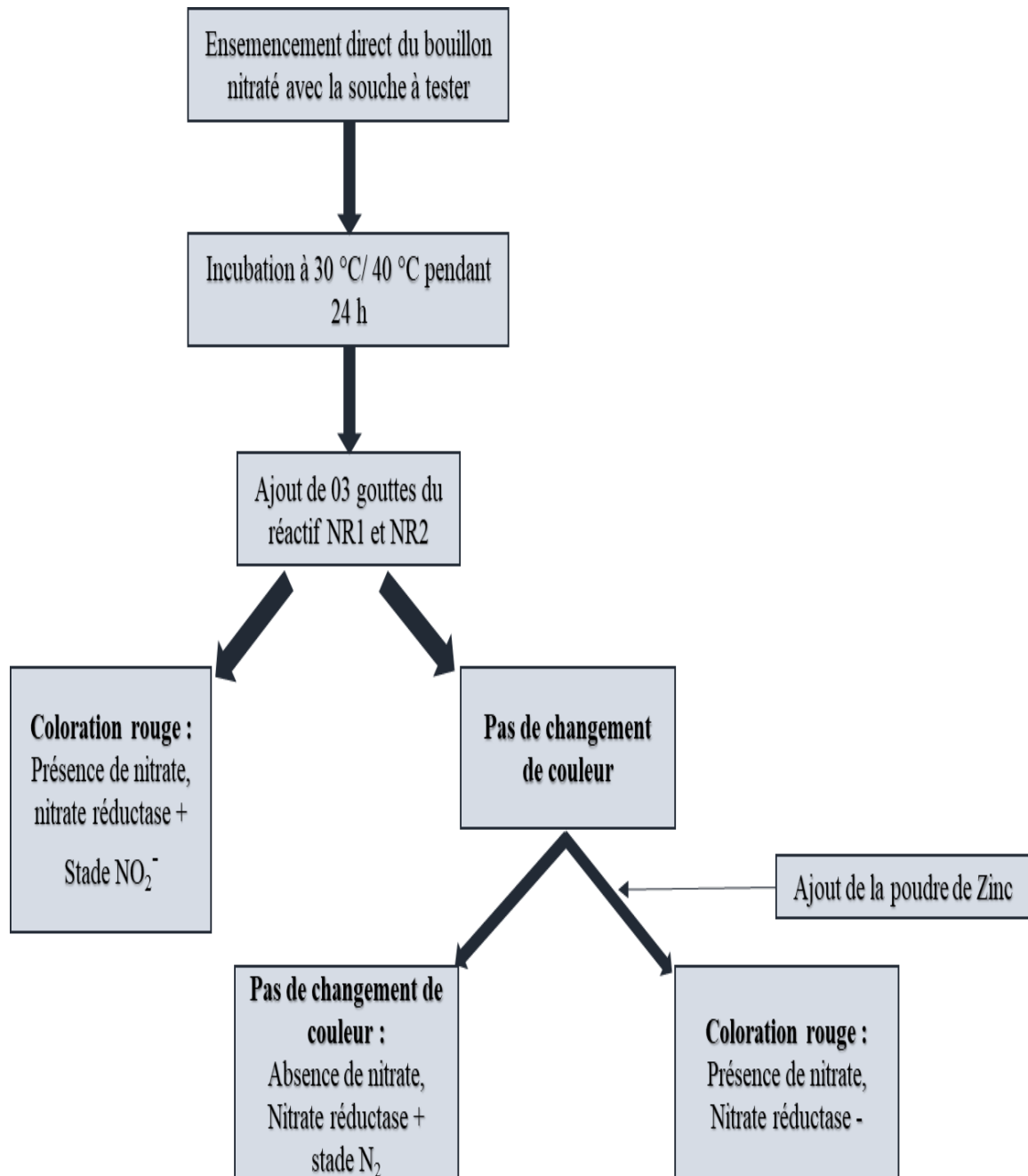


Figure 14 : Recherche de la nitrate réductase.

b. Dégradation du citrate de Simmons

➤ Principe

Le milieu citrate de Simmons permet d'étudier l'assimilation du citrate de sodium comme unique substrat carboné. Seules les bactéries possédant la citrate perméase sont capables de se développer sur ce milieu.

➤ Méthode

Le milieu est ensemencé par une strie centrale longitudinale sur la pente à l'aide d'une pipette Pasteur à partir d'une suspension bactérienne, puis incubé pendant 24 à 48 h à 30 °C ou 40 °C selon les souches.

➤ Lecture

- Citrate (+) : Le milieu de base devient bleu, c'est-à-dire qu'il y a un virage de couleur à cause de l'indicateur coloré, il y a une alcalinisation du milieu : la souche utilise le citrate comme seul et unique source de carbone.
- Citrate (-) : Le milieu de base reste vert, c'est à dire qu'il n'y a pas de virage de couleur et le milieu ne présente aucune culture : la souche n'utilise pas le citrate comme seul et unique source de carbone.

c. Fermentation des glucides

➤ Principe

La gélose TSI (gélose Triple Sugar Iron) est un milieu qui permet de mettre en évidence la fermentation du glucose (avec ou sans dégagement de gaz), du lactose et/ou du saccharose, et la réduction des sulfates en sulfures.

➤ Méthode

La pente est ensemencée par des stries et le culot par piqûre centrale à l'aide d'une pipette Pasteur. Le tube est ensuite incubé pendant 24 à 48 h à 30 °C ou 40 °C selon les souches.

➤ Lecture

L'utilisation de l'un des sucres contenus dans le milieu est révélée par une acidification, c'est-à-dire un 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 le noircissement du milieu dans la zone joignant le culot à la pente. En ce qui concerne le dégagement de CO₂, ce dernier est révélé par l'apparition de bulles d'air dans le culot ou le décollement de la gélose.

d. Recherche de la gélatinase

➤ Principe

La dégradation de la gélatine a pour but de mettre en évidence le potentiel protéolytique des différents microorganismes et leur capacité à dégrader ce composé protéique par l'enzyme gélatinase.

➤ Méthode

Le bouillon gélatiné a étéensemencé par une colonie bactérienne à l'aide d'une pipette Pasteur stérile. Le bouillon a été incubé à 30 °C ou à 40 °C selon les isolats pendant 24 h. Après incubation, les tubes ont été mis dans le réfrigérateur à 4 °C pendant 30 min.

➤ Lecture

- Gélatine (+) : Le milieu reste liquéfié, cela signifie que l'isolat possède l'enzyme gélatinase, donc l'enzyme a dégradé la gélatine.
- Gélatine (-) : Le milieu se solidifie, cela signifie que l'isolat n'a pas l'enzyme gélatinase, donc pas de dégradation de la gélatine.

e. Recherche de l'uréase

➤ Principe

L'hydrolyse de l'urée en carbonate d'ammoniaque se fait grâce à une enzyme dite uréase. Cette enzyme est synthétisée par les microorganismes afin d'utiliser l'urée comme seule source d'azote. Cette hydrolyse provoque une alcalinisation qui se traduit par l'apparition d'une couleur rose.

➤ Méthode

Un bouillon urée a étéensemencé avec une colonie prélevée sur le milieu d'isolement. Le tube a été ensuite incubé pendant 24 h à 48 h à 30 °C ou à 40 °C selon les souches.

➤ Lecture

- Uréase (+) : Présence d'une couleur rose vif dans le bouillon.
- Uréase (-) : Pas de changement de couleur.

f. Recherche de la production d'indole

➤ Principe

Ce test est a pour but de déterminer la capacité d'un microorganisme à dégrader l'acide aminé tryptophane et produire de l'indole. La production d'indole est mise en évidence par l'addition du réactif du Kovacs qui agit avec l'indole en donnant une coloration rouge à la surface du bouillon.

➤ **Méthode**

Un bouillon EPI (Eau Peptonée exempte Indole) a étéensemencé avec une culture jeune de 24 h à l'aide d'une pipette Pasteur stérile. Le bouillonensemencé a été ensuite incubé pendant 24 h à 30 °C ou 40 °C selon la souche à tester. Après incubation, 05 gouttes du réactif de Kovacs ont été ajoutées au bouillon ; la lecture a été réalisée après 30 secondes après l'ajout du réactif.

➤ **Lecture**

- Indole (+) : Un résultat positif est indiqué par la présence d'un anneau rouge à la surface du bouillon.
- Indole (-) : Un résultat négatif est indiqué par l'absence de l'anneau rouge dans le bouillon.

g. Dégradation du mannitol et recherche de la mobilité

➤ **Principe**

Le milieu mannitol mobilité est un milieu faiblement gélosé qui a pour but de tester la capacité des microorganismes à dégrader le mannitol et à mettre en évidence la mobilité.

➤ **Méthode**

A l'aide d'une pipette Pasteur, le milieu mannitol mobilité a étéensemencé par une piqure centrale jusqu'au fond du milieu. Le milieu a été incubé à 30 °C ou 40 °C selon les souches pendant 24 h.

➤ **Lecture**

- Mannitol (+) : Virage du milieu au jaune ; ce qui signifie la fermentation du mannitol.
- Mannitol (-) : Pas de changement de couleur (milieu rouge) ; ce qui signifie l'absence de la fermentation du mannitol.
- Mobilité (+) : Répartition des colonies dans toute la gélose.
- Mobilité (-) : Développement uniquement dans la piqure centrale.

h. Production d'acétoïne

➤ **Principe**

Le test se fait sur le milieu Clark et Lubs, et a pour but de mettre en évidence la fermentation des différents sucres principalement le glucose par les microorganismes afin de produire l'acétoïne (acétyl méthyl carbinol), ainsi que, la révélation se fait par la réaction de VP et RM.

➤ **Méthode**

Un bouillon Clark et Lubs a étéensemencé avec une culture pure de 18 à 24 heures. Le bouillon a été ensuite incubé pendant 24 h à 30 °C ou 40 °C selon les isolats. Après incubation, 03 gouttes du réactif VP1 et 03 gouttes du réactif VP2, ont été ajoutées au bouillon. Ce dernier a été ensuite agité, et la lecture a été réalisée après environ 15 min.

Pour le test du rouge de méthyle (RM), consiste en l'ajout de quelques gouttes de rouge de méthyle sur un bouillon Clark et Lubs après 24 h à 30 °C d'incubation.

➤ **Lecture**

- Coloration rouge (en surface), présence d'acétoïne.
- Pas de coloration rouge, absence d'acétoïne.
- Le milieu reste rouge : La bactérie est dite RM+.
- Le milieu vire au jaune : La bactérie est dite RM-.

i. Type respiratoire

➤ **Principe**

La gélose viande foie est un milieu de culture, utilisé principalement pour la détermination du type respiratoire des microorganismes.

➤ **Méthode**

Après avoir fait fondre la gélose dans un bain Marie à 100 °C pendant 30 min, un ensemencement a été fait sur une gélose maintenue en surfusion, à l'aide d'une pipette Pasteur stérile, par une pique centrale, puis en remontant et en tournant sous forme d'une hélice dans tout le tube.

➤ **Lecture**

- Aéro-anaérobie facultatif : Culture des microorganismes sur toute la hauteur du tube gélosé.
- Aérobie stricte : Culture des microorganismes uniquement à la surface du tube gélosé.
- Anaérobie stricte : Culture des microorganismes uniquement à la profondeur du tube gélosé.
- Microaérophiles : Culture des microorganismes dans un milieu où la concentration en oxygène est inférieure à la concentration atmosphérique.

2.4.3 Mise en évidence de quelques activités hydrolytiques extracellulaires

Quelques activités enzymatiques ont été recherchées pour les souches isolées.

2.4.3.1 Recherche de la cellulase

Ce test a été réalisé sur une gélose nutritive contenant de la cellulose (100 mL de GN avec 1 g de cellulose). Après incubation, les boîtes de Petri ont été inondées par une solution de rouge congo à 0,1 % (p/v) et incubées pendant 15 à 30 minutes. La production de cellulase est indiquée par l'apparition de zones claires autour des colonies.

2.4.3.2 Recherche de l'amylase

La présence ou l'absence de l'enzyme amylase a été mise en évidence en cultivant les isolats sur une gélose nutritive contenant 1 % (p/v) d'amidon soluble. La lecture se fait par inondation des boîtes avec une solution de lugol. La présence de zones claires autour des colonies témoigne de l'hydrolyse de l'amidon. En revanche, les zones contenant de l'amidon se colorent en bleu.

2.4.3.3 Recherche de la caséinase

Ce test permet la mise en évidence de l'hydrolyse de la caséine sur agar doublement concentrée additionnée de lait écrémé. La présence d'une activité caséinolytique est indiquée par la présence d'un halo clair autour des colonies suite à l'hydrolyse de la caséine.

2.4.3.4 Recherche de la lipase

L'activité lipolytique a été mise en évidence en ajoutant du Tween 80 stérile à une concentration de 1 % (v/v) au milieu de base stérile en surfusion contenant 0,01 % de CaCl₂. Une lecture positive est traduite par l'apparition des cristaux autour des colonies productrices d'estérase.

2.4.3.5 Recherche de la lécithinase

Pour mettre en évidence l'activité lécithinase, 10 mL d'émulsion de jaunes d'œufs a été ajouté à 10 mL de gélose nutritive. Après une incubation de 24 h à 30 ou 40 °C, une zone de précipitation blanche, opaque et diffuse s'étendant au-delà des limites de la colonie indique une activité positive de la lécithinase de la souche testée.

2.4.4 Etude des caractères physiologiques

L'étude physiologique, consiste à évaluer la capacité des isolats à croître à différentes températures, à différentes gammes de pH et à différentes concentrations de NaCl. Le bouillon nutritif (BN) a été utilisé comme milieu de culture pour l'étude des caractères physiologiques. La croissance de la souche est indiquée par la présence d'un trouble, ainsi que par une mesure spectrométrique à une longueur d'onde de 420 nm.

2.4.4.1 Influence de la température sur la croissance


L'influence de la température sur la croissance a été testée en incubant les cultures des souches dans les milieux liquides (bouillon nutritif) à différentes températures (30 °C, 40 °C et 50 °C) pendant 72 h.

2.4.4.2 Influence du pH sur la croissance

L'influence du pH sur la croissance des souches a été testée en incubant les cultures des souches dans les milieux liquides (bouillon nutritif) à différentes gammes de pH (pH 5 et 9) pendant 72 h à 30 °C ou 40 °C selon les souches.

2.4.4.3 Influence de la salinité sur la croissance

La tolérance au NaCl sur la croissance des souches a été testée en incubant les cultures des souches dans les milieux liquides (bouillon nutritif) à différentes concentrations de NaCl (5 % et 9 %) pendant 72 h à 30 °C ou 40 °C selon les souches.



**Résultats et
discussion**

I. Résultats

Dans ce chapitre, les résultats de l'analyse pédologique de notre échantillon de sol provenant d'une sebkha située dans le Nord-Ouest algérien, ainsi que les résultats des isolements réalisés sur ce même sol, sont présentés.

1. Analyse pédologique

1.1 Analyses physico-chimiques

Le résultat des analyses physico-chimiques du sol de la sebkha sont présentés dans le tableau ci-dessous.

Tableau 11: Résultats des analyses physico-chimiques du sol.

Paramètre	Résultat	Interprétation
Granulométrie	84 %	Sable fin
	16 %	Sable moyen
pH	8.7 (entre 8.1 et 9)	Alcalin
Conductivité Electrique	15.25 dS /m	Très salé
Chlorure	/	Absence
Carbonate	/	Absence
Bicarbonate	/	Absence
Carbone Organique	0.98 %	Très pauvre
Matière Organique	1.68 %	Très pauvre
Calcaire Total	32.68 %	Fortement calcaire
Calcaire Actif	16.75 %	CaCO ₃ élevé
Azote	0.03 %	Sol pauvre
Phosphore	31.58 ppm	Sol pauvre
Sulfate	25%	Elevé

D'après les résultats obtenus, les valeurs du pH varient entre 8.1 et 9 ; le pH est donc légèrement alcalin à alcalin selon les normes de Baize. (1988). Les valeurs de la conductivité électriques sont entre 8 dS/m et 20 dS/m pour notre échantillon de sol (sol très salé), selon les normes de Aubert. (1978).

Nous remarquons également une absence des chlorures, ainsi que la présence des sulfates avec de fortes valeurs (25 %). En outre, nous remarquons une absence totale de carbonate CO₃²⁻ et de bicarbonates HCO₃⁻, ainsi que des faibles valeurs observées en carbone organique, en matière organique, en azote (N) et en phosphore (P) (0.98 %, 1.68 %, 0.03 % et 31.58 ppm, respectivement). L'analyse chimique a donné des valeurs élevées pour les éléments suivants : le calcaire total (32.68 %), et le calcaire actif (16.75 %) dans notre échantillon de sol.

Concernant les résultats, la pauvreté du milieu en matière organique, et son pH basique, explique l'absence des actinomycètes.

2. Isolement des bactéries

L'ensemencement direct d'une suspension de sol (eau physiologique + sol) avec les différentes dilutions sur les milieux de culture ISP1, ISP2, Bennett et Luria Bertani, n'a pas permis l'isolement des bactéries à une température de 30 °C. De ce fait, une étape d'enrichissement (sans réalisation des dilutions décimales) sur bouillon eau peptonée tamponnée a été réalisée pour favoriser la croissance des bactéries présentes dans notre échantillon de sol. Par ailleurs, les cultures réalisées à une température de 40 °C, n'ont pas nécessité un enrichissement.

Les ensemencements réalisés sur les différents milieux à 30 °C et 40 °C, ont donc permis l'apparition de plusieurs types de colonies. Les repiquages successifs ont permis au final d'obtenir 15 isolats purifiés, dont 04 isolats après une incubation à 30 °C (après une étape d'enrichissement), et 11 isolats après une incubation à 40 °C (sans étape d'enrichissement). Le tableau 12 représente les différents isolats obtenus dans chaque milieu de culture à différentes températures.

Tableau 12 : Différents types d'isolats obtenus dans chaque milieu de culture à différentes températures.

Milieux de culture	Températures	
	30 °C pendant 24 h	40 °C pendant 72 h
Milieu ISP1	S1	S9, S10, S11, S12, S13
Milieu ISP2	S2	S14, S15
Milieu Bennett	S3	S5, S6
Milieu Luria Bertani	S4	S7, S8

2.1 Caractérisation des isolats bactériens

2.1.1 Etude phénotypique

Les isolats bactériens ont montré divers aspects culturels, en fonction du milieu de culture utilisé.

2.1.1.1 Etude macroscopique

Les colonies qui se sont développées sur les différents milieux de culture utilisés pour leur isolement, ont été observées à la loupe binoculaire. Le résultat de l'examen macroscopique est présenté dans le tableau 13.

Tableau 13: Caractères cultureux des souches.

Souche Critère	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14	S15
Diamètre	2mm	3mm	3mm	3mm	2mm	>1mm	4mm	>1mm	4mm	4mm	4mm	>1mm	>1mm	>1mm	>1mm
Forme	RI	RR	RI	RR	RR	RI	RR	OI	RR	RI	RI	OI	OI	OI	OI
Couleur	Blanche	Crème	Blanche	Crème	Crème	Crème	Blanche	Crème	Blanche	Blanche	Blanche	Blanche	Crème	Crème	Crème
Opacité	T	T	T	O	O	O	T	O	T	T	O	O	O	O	O
Surface	BL	BG	MG	ML	BL	BR	BL	MR	BL	BL	ML	MG	BG	MG	BL
Élévation	Plate	Plate	Plate	Bombée	Bombée	Bombée	Centrée	Plate	Bombée	Centrée	Plate	Plate	Plate	Plate	Bombée
Consistance	HH	HH	HS	HS	HH	HH	HH	HS	HH	HH	HS	HS	HH	HS	HH
Odeur	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
Pigment	-	Maron	-	Maron	Maron	Rouge	-	Maron	-	-	-	-	Maron	Maron	Maron

- = Absence ; + = Présence ; HH = Homogène humide ; HS = Homogène sèche ; T = Translucide ; O = Opaque ; BL = Brillante lisse ; BG = Brillante granuleuse ; MG = Mate granuleuse ; ML = Mate lisse ; MR = Mate rugueuse ; BR = Brillante rugueuse ; RI = Ronde irrégulière ; RR = ronde régulière ; OI = Ondulée irrégulière

Après incubation, la plupart des souches forment des colonies rondes, plates, opaques, de grande taille, de surface lisse, et à bord irrégulier. D'autres aspects macroscopiques ont été également observés, tels que la forme et le contour réguliers, le diamètre petit, un relief bombé et une surface translucide (Figure 15).

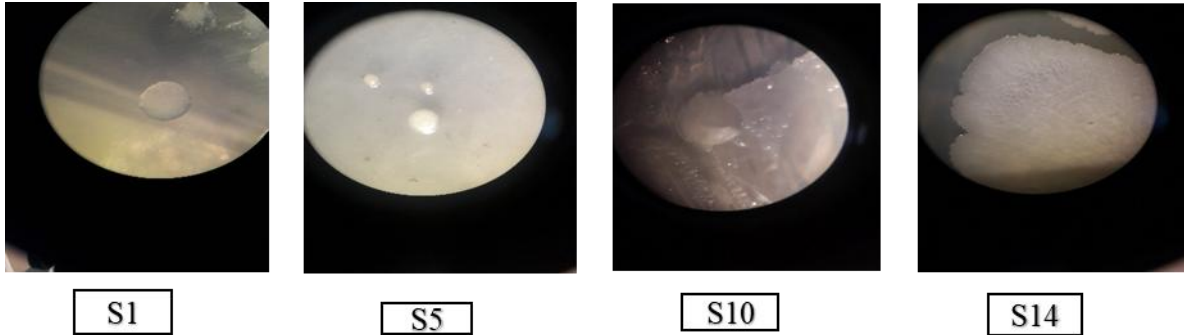


Figure 15 : Observation macroscopique de quelques isolats.

2.1.1.2 Etude Microscopique

Après la coloration de Gram, tous les isolats ont été examinés sous microscope optique afin d'observer le type de Gram, ainsi que la forme, le regroupement et la présence ou l'absence de spore. Le résultat de l'examen microscopique est présenté dans le tableau 14.

Tableau 14 : Etude microscopique des isolats bactériens.

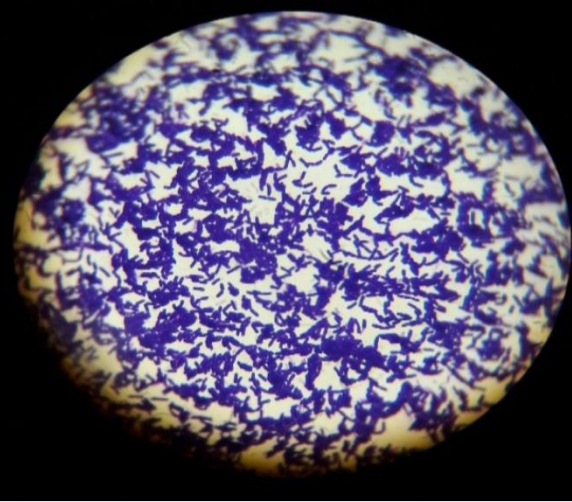
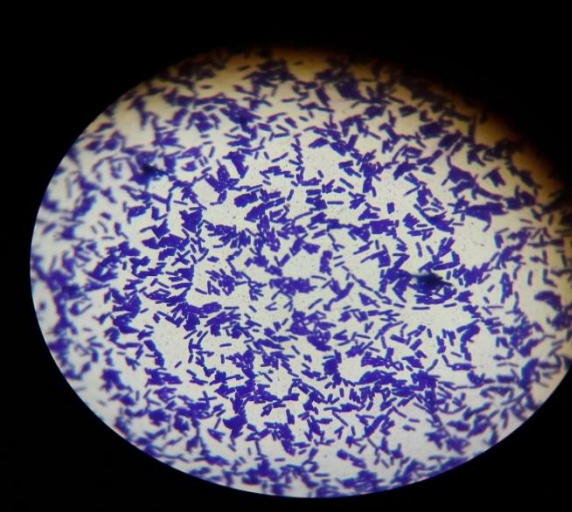
Critères Souches	Coloration de Gram	Forme	Regroupement	Spore	Observation
S1	+	Long bâtonnet	En grappe	Asporulé	
S2	+	Long bâtonnet	En grappe	Spore terminale non déformante	

Tableau 14 : Etude microscopique des isolats bactériens (suite).

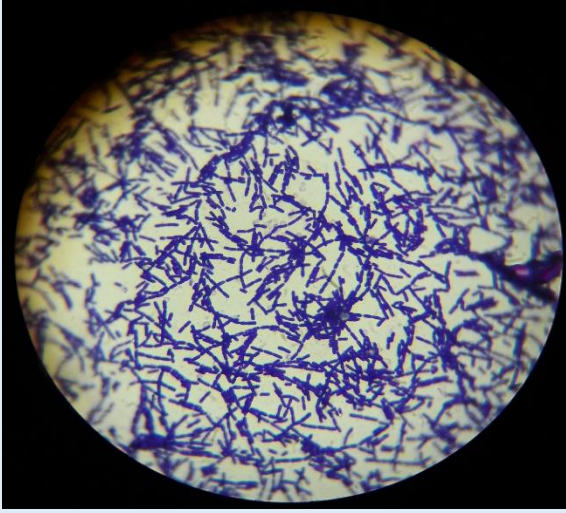
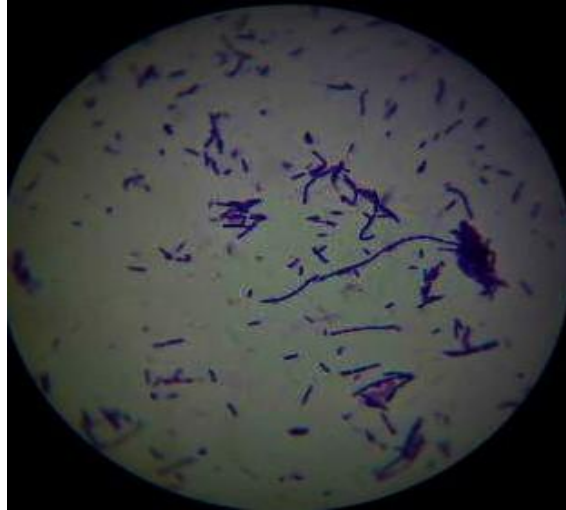
Critères Souches	Coloration de Gram	Forme	Regroupement	Spore	Observation
S3	+	Long bâtonnet	En chaînette	Spore terminale non déformante	
S4	+	Long bâtonnet	En chaînette	Spore terminale non déformante	

Tableau 14 : Etude microscopique des isolats bactériens (suite).


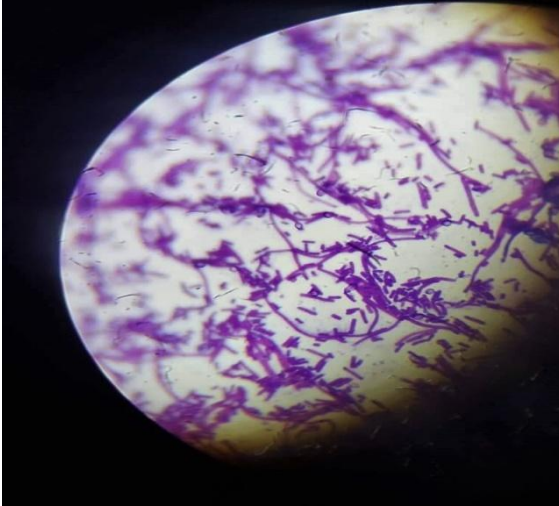
Critères Souches	Gram	Forme	Regroupement	Spore	Observation
S5	+	Long bâtonnet	Isolé	Asporulé	
S6	+	Long bâtonnet	Isolé	Asporulé	

Tableau 14 : Etude microscopique des isolats bactériens (suite).

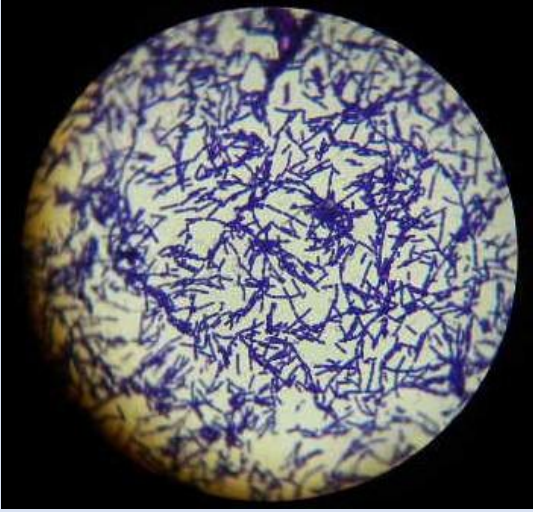

Critères Souches	Gram	Forme	Regroupement	Spore	Observation
S7	+	Long bâtonnet	En chaînette	Asporulé	
S8	+	Coccobacille	Isolé	Asporulé	

Tableau 14 : Etude microscopique des isolats bactériens (suite).


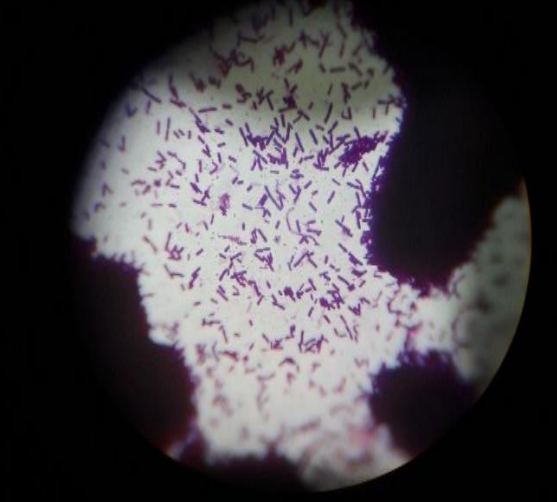
Critères Souches	Gram	Forme	Regroupement	Spore	Observation
S9	+	Long bâtonnet	Isolé	Asporulé	
S10	+	Coccobacille	Isolé	Asporulé	

Tableau 14 : Etude microscopique des isolats bactériens (suite).

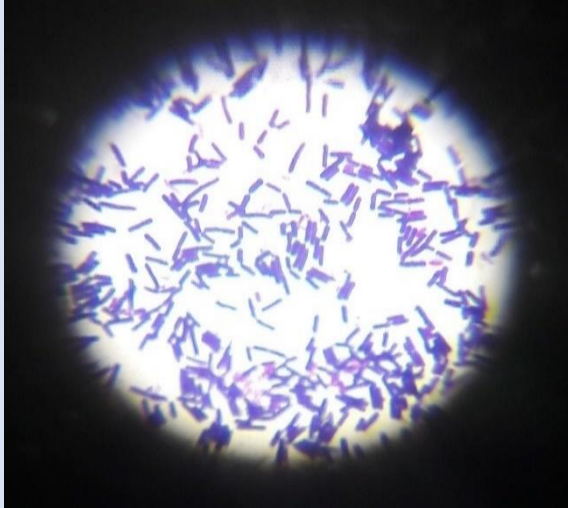
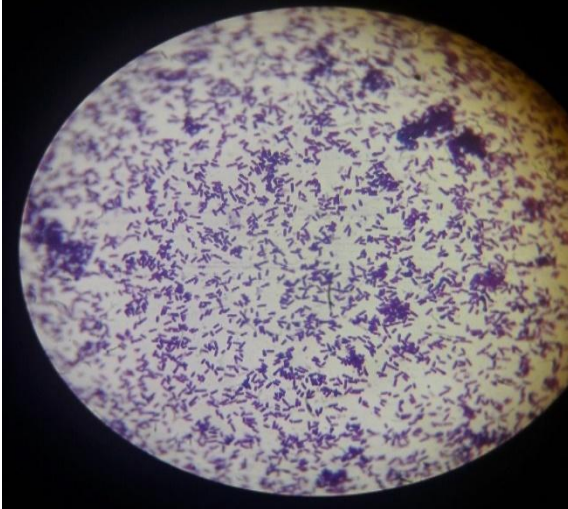
Critères Souches	Gram	Forme	Regroupement	Spore	Observation
S11	+	Coccobacille	Isolé	Asporulé	
S12	+	Coccobacille	Isolé	Spore terminale déformante	

Tableau 14 : Etude microscopique des isolats bactériens (suite).



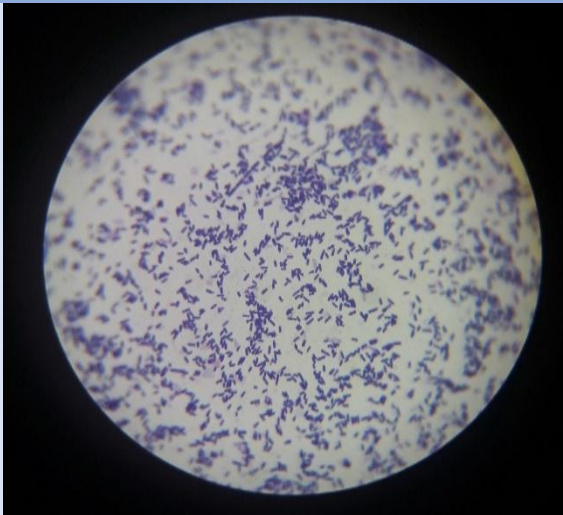
Critères Souches	Gram	Forme	Regroupement	Spore	Observation
S13	+	Long bâtonnet	En chaînette	Asporulé	
S14	+	Long bâtonnet	Isolé	Asporulé	

Tableau 14 : Etude microscopique des isolats bactériens (suite et fin).

Critères Souches	Gram	Forme	Regroupement	Spore	Observation
S15	+	Coccobacille	Isolé	Asporulé	

2.1.2 Tests biochimiques

D'après le tableau 15, sur les 15 souches isolées, 13 d'entre elles sont catalase positives et 02 sont catalase négatives, et 08 isolats (S1, S4, S5, S7, S8, S9, S12, S15) sont oxydase positives et 07 (S2, S3, S6, S10, S11, S13, S14) sont oxydases négatives. L'ensemble des isolats ont un métabolisme aéro-anaérobie facultatif. De plus, un seul isolat (S5) s'est révélé être nitrate réductase positive stade nitrite (NO_2^-) et 03 isolats (S1, S2, S3) se sont révélés être nitrates réductase négative.

En outre, nous remarquons que tous les isolats sont mobiles et dégradent le mannitol. Douze souches (S1, S2, S5, S7, S8, S9, S10, S11, S12, S13, S14, S15) sont dépourvues de l'enzyme citrates perméase et ne peuvent donc pas utiliser le citrate comme seule source de carbone et d'énergie. De plus, le développement de quelques colonies sur la gélose TSI a été observé mais sans virage de la couleur de la pente et du culot. Néanmoins, un dégagement gazeux sans production de H_2S a été remarqué pour quelques souches (S8, S11, S12, S13, S15).

La production d'acétoïne a été confirmée sur 06 isolats (S5, S7, S8, S9, S12, S15). Nos résultats montrent également la présence uniquement de trois souches uréolytiques (S3, S10, S12), et 07 isolats (S4, S7, S9, S10, S11, S12, S14) capables de dégrader la gélatine.

Tableau 15 : Résultats des tests biochimiques.

Caractères Souches	Catalase	Oxydase	Nitrate réductase	TSI					Mannitol- Mobilité		Citrate Perméase	Viande -Foie	Acétoïne		Indole	Uréase	Gélatinase
				Glu	Lac	Sac	H ₂ S	Gaz	Man	Mob			VP	RM			
S1	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	AAF	-	+	-	-	-
S2	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	AAF	-	+	-	-	-
S3	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	AAF	-	+	-	+	-
S4	+	+	+ (N ₂)	+	-	-	-	-	+	+	+	AAF	-	+	-	-	+
S5	-	+	+ (NO ₂ ⁻)	+	-	-	-	-	+	+	-	AAF	+	+	-	-	-
S6	+	-	+ (N ₂)	+	-	-	-	-	+	+	+	AAF	-	-	-	-	-
S7	+	+	+ (N ₂)	+	-	-	-	-	+	+	-	AAF	+	+	-	-	+
S8	+	+	+ (N ₂)	+	-	-	-	+	+	+	-	AAF	+	+	+	-	-
S9	+	+	+ (N ₂)	+	-	-	-	-	+	+	-	AAF	+	+	+	-	+
S10	+	-	+ (N ₂)	+	-	-	-	-	+	+	-	AAF	-	+	-	+	+
S11	+	-	+ (N ₂)	+	-	-	-	+	+	+	-	AAF	-	+	-	-	+
S12	+	+	+ (N ₂)	+	-	-	-	+	+	+	-	AAF	+	+	-	+	+
S13	-	-	+ (N ₂)	+	-	-	-	+	+	+	-	AAF	-	+	-	-	-
S14	+	-	+ (N ₂)	+	-	-	-	-	+	+	-	AAF	-	+	-	-	+
S15	+	+	+ (N ₂)	+	-	-	-	+	+	+	-	AAF	+	+	+	-	-

+ = Présence, - = Absence, AAF = aéro-anaérobie facultatif,

2.1.3 Criblage enzymatique

Le tableau 16 présente le résultat des tests enzymatiques réalisés sur les différents isolats.

Tableau 16 : Résultats des activités enzymatiques.

Enzymes Souches	Amylase	Cellulase	Caséinase	Lécithinase	Lipase
S1	+	+	+	+	+
S2	+	+	+	+	+
S3	+	+	-	+	+
S4	+	+	-	+	-
S5	-	-	+	-	+
S6	-	-	+	+	+
S7	-	-	+	-	-
S8	+	+	+	+	+
S9	+	+	+	-	+
S10	+	+	+	+	+
S11	-	+	-	+	+
S12	+	-	-	+	+
S13	+	+	+	+	+
S14	+	-	+	+	+
S15	-	-	+	+	+

2.1.3.1 Recherche de l'amylase

D'après les résultats présentés dans le tableau 17, l'hydrolyse de l'amidon est réalisée par 10 isolats (S1, S2, S3, S4, S8, S9, S10, S12, S13, S14). La plupart des isolats possèdent donc une amylase dont l'activité s'exprime par l'apparition d'un halo d'éclaircissement autour des colonies après addition d'une solution de lugol.

2.1.3.2 Recherche de la cellulase

Après 24 h d'incubation, seuls 09 isolats (S1, S2, S3, S4, S8, S9, S10, S11, S13) ont montré des résultats positifs et ont pu dégrader la cellulose, qui représente la seule source de carbone dans le milieu.

2.1.3.3 Recherche de la lécithinase

D'après le tableau 17, seuls trois isolats (S5, S7, S9) n'ont pas été capable de dégrader la lécithine présente dans la gélose préparée à base de jaune d'œuf. Le reste des isolats a montré que cette activité est présente et bien mise en évidence par l'apparition d'une zone blanche, opaque et diffuse qui s'étend dans le milieu entourant les colonies.

2.1.3.4 Recherche de la caséinase

L'hydrolyse de la caséine du lait est observée chez 11 souches, qui sont marquées par la présence d'une surface claire (halo) aux alentours de la zone de croissance.

2.1.3.5 Recherche de la lipase

Les lipases sont secrétées par la majorité des souches, à l'exception de deux souches la S4 et la S7, qui ont démontré des résultats négatifs pour l'hydrolyse du Tween 80.

2.1.4 Etude des caractères physiologiques

Pour déterminer les différentes caractéristiques physiologiques des isolats, plusieurs tests ont été effectués. Le tableau 17 présente le résultat de l'étude physiologique des isolats après une mesure spectroscopique à une longueur d'onde de 420 nm.

Tableau 17 : Physiologie de la croissance des souches en fonction de la température, du pH et du NaCl.

Paramètre Souches	T °C			pH		[NaCl] %	
	30 °C	40 °C	50 °C	5	9	5	7
S1	0.404	0.487	0.669	0.200	1.259	0.368	0.490
S2	0.312	0.352	0.371	0.158	1.103	0.205	0.243
S3	0.141	0.776	0.787	0.127	1.132	0.241	0.150
S4	0.425	0.664	0.776	0.039	0.500	0.571	0.764
S5	0.146	0.127	0.300	0.609	0.742	2.330	2.230
S6	0.143	0.195	0.532	0.547	0.166	2.813	2.836
S7	0.164	0.332	0.512	0.516	0.288	2.329	2.502
S8	0.026	0.299	0.301	0.373	0.184	0.804	0.833
S9	0.811	2.283	0.079	0.103	2.314	2.726	2.631
S10	0.373	2.324	0.054	2.258	1.718	2.230	2.130
S11	1.356	2.732	0.630	2.243	0.244	2.295	2.728
S12	0.888	2.740	0.299	2.741	2.347	2.713	2.736
S13	1.004	2.724	0.059	2.286	2.302	2.217	2.479
S14	1.019	2.257	0.248	2.328	2.291	2.229	2.402
S15	1.241	2.736	0.353	2.309	2.716	0.704	0.733

2.1.4.1 Croissance à différentes températures

Les résultats obtenus ont révélé que tous les isolats ont la capacité de croître à des températures de 30 °C, 40 °C et 50 °C. Selon le tableau 18, 08 isolats (S1, S2, S3, S4, S5, S6, S7 et S8) ont montré une aptitude à croître à 50 °C avec une croissance maximale à cette température, qui pourrait correspondre à leur température optimale de croissance. En ce qui concerne les 07 autres souches (S9, S10, S11, S12, S13, S14, S15), ces dernières se développent à 40 °C, qui semblerait être leur température optimale de croissance.

2.1.4.2 Croissance à différentes gammes de pH

Les résultats de la croissance des 15 isolats étudiés à différents pH, révèlent une aptitude de l'ensemble des souches à croître sur le bouillon BN à pH 5 et 9. Les isolats S1, S2, S3, S4, S5, S9, S13 et S15 ont montré une croissance optimale à pH 9. En ce qui concerne les souches S6, S7, S8, S10, S11, S12, S14, ces dernières ont montré une bonne croissance à pH 5.

2.1.4.3 Croissance à des concentrations croissantes de NaCl

Ce test a été réalisé pour déterminer la concentration en NaCl tolérée par les différents isolats sur bouillon BN. Pour cela, deux concentrations de NaCl ont été testées, à savoir 5 et 7 %. Les résultats obtenus ont montré que toutes les souches étudiées ont pu se développer en présence de NaCl. Selon le tableau 18, 11 isolats (S1, S2, S4, S6, S7, S8, S11, S12, S13, S14, S15) ont montré une meilleure croissance à une concentration de NaCl de 7 %. En ce qui concerne les souches S3, S5, S9, S10, elles ont montré une croissance optimale à 5 % de NaCl.

II. Discussion

Dans cette étude, des analyses pédologiques et physico-chimiques d'un sol prélevé dans une Sebkha située dans le Nord-Ouest algérien, ont été effectuées. L'étude granulométrique de ce sol a permis de déterminer deux classes granulométriques ; il s'agit des sables fins qui sont très abondants (84 %) et des sables moyens qui sont peu abondants (16 %). Une étude réalisée en 2021 par Bousid et Annab, a montré que le sol de la sebkha de Garaet Annk Djemel de la wilaya d'Oum El Bouaghi, était constitué essentiellement d'argiles avec la présence de terres arables et de limons. Une autre étude réalisée par Guittoum en 2017, a révélé une dominance de 65 % de la texture limono-sableuse au niveau du sol de la sebkha de Melloul de la wilaya de Sétif. De plus, selon la fiche descriptive sur les zones humides Ramsar, le sol d'une sebkha localisée à Ain M'Lila est caractérisé par une prédominance d'argiles et de limons.

D'après les résultats obtenus dans notre étude, les valeurs du pH du sol varient entre 8.1 et 9, ce qui signifie qu'il s'agit d'un sol légèrement alcalin à alcalin. De plus, notre échantillon de sol a présenté une conductivité électrique de 15.25 dS/m, ce qui en fait un sol très salé. Une étude réalisée par Chamekh et al. (2019), a montré que le sol de la grande sebkha d'Oran, située dans la même région que notre sebkha, était également alcalin avec un pH de 8.0 et un taux de salinité élevé. Une autre étude réalisée sur le sol de la sebkha de Melloul à Sétif par Zitouni et Meguedmi, (2021), a montré que ce sol présente des valeurs de CE entre 0.46 dS/m et 22.61 dS/m, avec une large gamme de salinité.

En outre, les bactéries halotolérantes associées au sol de cette sebkha ont été également étudiées. En effet, un total de 15 isolats ont fait objet d'une étude phénotypique, biochimique, enzymatique et physiologique. Quatre souches ont été isolées à 30 °C et 11 souches à 40 °C sur les milieux ISP1, ISP2, Luria Bertani et Bennett. L'ensemble des souches isolées se sont révélées être mobiles, Gram positives, avec un métabolisme respiratoire aéro-anaérobie facultatif. Les souches S1, S2, S3, S4, S5, S7, S9, S13 et S14 sont apparues comme de longs bâtonnets, alors que les souches S6, S8, S10, S11, S12 et S15 sont apparues comme des coccobacilles, avec la capacité de former des spores pour certains isolats iniquement (S2, S3, S4 et S12). Des résultats similaires ont été obtenus dans une étude réalisée par Saibi et al. (2022), dans laquelle un total de 17 souches ont été isolées dans la grande Sebkha d'Oran, dans le Nord-Ouest algérien. Cependant, une autre étude réalisée sur cette même sebkha, n'a aboutit qu'à l'isolement de 03 souches par Nas et al. (2021). Dans cette dernière étude, la coloration de Gram a révélé que les 03 isolats étaient des bâtonnets mobiles Gram positifs, aéro-anaérobies facultatifs, avec des endospores subterminales ellipsoïdales. Ben Abdallah. (2014) quant à lui, a réussi à isoler du sol de la sebkha d'Oran, cinquante-neuf souches avec un aspect de bâtonnets à Gram positif et capables de former des spores.

Dans notre étude, bien que la plupart des souches isolées présente des aspects morphologiques proches, les analyses biochimiques au contraire ont révélé quelques différences, témoignant d'une diversité métabolique importante chez ces isolats. De plus, ces différences signifient que certains isolats pourraient appartenir à la même espèce mais qu'il s'agirait de souches différentes avec des caractéristiques distinctes. Il semblerait que la plupart des isolats appartiendrait au genre *Bacillus* même si cela doit être confirmé par un séquençage

du gène de l'ARN 16S. Les travaux de Saibi et al. (2022), ont permis l'isolement de 08 souches appartenant au genre *Bacillus*, 08 souches au genre *Virgibacillus*, et une souche appartenant au genre *Halomonas*, à partir du sol d'une sebkha dans le Nord-Ouest algérien.

Par ailleurs, dans notre étude, quelques souches isolées à partir du milieu Bennett à 40 °C sont suspectées d'être des actinomycètes (S5, S6, S9) selon les observations macroscopiques et microscopiques. Toutefois une analyse moléculaire est également nécessaire pour le confirmer. De plus, il aurait été judicieux d'allonger la période d'incubation (21 jours par exemple) pour favoriser le développement de ces actinobactéries. En effet, selon une étude réalisée par Menasria et al. (2022), 31 souches d'actinomycètes halophiles ont été isolées à partir de milieux MH additionnés de 5, 10 et 15 % (P/V) de sels après 3 semaines à 30 °C. Le séquençage de leurs ARNr 16S, a révélé la présence de membres affiliés à des genres d'actinobactéries halophiles rares (*Actinopolyspora* avec 74.19 %, qui correspond à 23 isolats sur 31 et *Nocardiopsis* avec 25.8 %, qui correspond à 8 isolats sur 31). En outre, une étude réalisée par Smati et Kitouni. (2019), a permis l'isolement de plusieurs actinobactéries dans le sol de deux sebkhas situées dans le Nord-Est Algérien, après une incubation de 3 semaines à 30 °C. Ces isolats tolèrent principalement 2.5 et 10 % de NaCl et appartiennent aux genres *Nocardiopsis*, *Streptomyces* et *Rhodococcus*. Toujours dans cette même étude, le clonage moléculaire a permis l'obtention de 39 clones : les clones du site Ezzemoul sont affiliés aux genres *Demequina*, *Plantactinospira*, *Friedmanniella* et *Mycobacterium*, et les clones du site Djendli sont apparentés aux genres *Marmoricola*, *Phytoactinopolyspora*, *Streptomyces*.

Le criblage enzymatique a montré que les souches isolées sont dotées d'un bagage enzymatique intéressant. En effet, les souches S1, S2, S8, S10 et S13 sont capables de produire une amylase, une cellulase, une lécithinase, une caséinase et une lipase, témoignant de la présence d'une diversité enzymatique importante. Les activités amylase, cellulase, gélatinase, caséinase, lécithinase et lipase se classent au premier rang des enzymes courantes. Néanmoins, le reste des souches ont également la capacité de produire des enzymes mais de manière moins diversifiée. Le criblage d'enzymes extracellulaires réalisé par Saibi et al. (2022) sur les souches isolées du sol de la sebkha d'Oran, a montré que tous les isolats étaient capables de produire au moins deux enzymes, et que les activités gélatinase et caséinase étaient les plus produites. De plus, ces auteurs ont montré que ces souches présentaient également une activité antimicrobienne contre les bactéries Gram-positives, *Candida albicans*, *Fusarium* et *Penicillium*. Ces résultats nous encouragent à poursuivre cette étude et à réaliser un criblage de la production de composés antimicrobiens par les souches isolées dans notre étude.

En ce qui concerne l'étude physiologique, l'ensemble des isolats ont montré une aptitude à croître à différentes gammes de température (30, 40 et 50 °C), de pH (5 et 9) et de salinité (5 et 7 % de NaCl). Certaines souches ont même montré une croissance maximale à une température de 50 °C, à un pH de 5 et à une concentration de 7 % de NaCl à la fois. C'est le cas des souches S6, S7 et S8, qui pourrait en plus de leur caractère halotolérant être qualifiées d'acidotolérantes et de thermotolérantes. Les souches S1, S2 et S4 peuvent être quant à elles qualifiées d'halotolérantes, d'alcalitolérantes et de thermotolérantes. D'autres souches isolées sont juste halotolérantes et acidotolérantes, ou halotolérantes et alcalitolérantes. La présence de souches halotolérantes et alcalitolérantes est en adéquation avec les résultats obtenus dans

l'analyse physico-chimique, qui a montré que le sol étudié est légèrement alcalin à alcalin et très salé.

Les bactéries capables de se développer dans des conditions alcalines en présence de sel sont appelées halo-alcaliphiles ; elles sont dotées de mécanismes d'adaptation spéciaux leur permettant de survivre et croître dans la salinité et le pH alcalin (Khalef, 2019). En effet, ces deux caractères sont souvent conjugués, et il a été démontré que l'alcali-résistance ou même l'alcaliphilie exigerait la présence intracellulaire d'ions sodium pour la régulation du métabolisme. De ce fait, la plupart des organismes alcaliphiles sont au moins halotolérants. Cette tolérance peut s'étendre sur de larges intervalles de pH, ce qui signifie qu'elles peuvent également se développer à des pH acides grâce à des mécanismes d'acidotolérance (Lewinson et al., 2004).



**Conclusion et
perspectives**

L'objectif principal de cette étude était d'isoler des souches bactériennes halotolérantes à partir d'un sol de Sebkhia située au Nord-Ouest algérien, qui constitue un écosystème hypersalé naturel. Notre démarche s'est appuyée sur une approche bactériologique classique basée sur l'isolement et la purification des souches bactériennes sur des milieux sélectifs. Nous avons également réalisé une analyse physico-chimique de ce sol.

L'analyse granulométrique a permis de déterminer la nature de notre échantillon de sol qui est sableuse, avec une valeur de 84 % de sable fin et 16 % de sable moyen. Quant à l'analyse physico-chimique, elle a montré l'absence de carbonate, de bicarbonate et du chlorure, avec de faibles valeurs en carbone organique, en matière organique, en azote (N) et en phosphore (P). Ces analyses ont également montré des valeurs élevées pour les éléments suivants : calcaire totale (32.68 %), calcaire actif (16.75 %) et sulfate (25 %). De plus, notre sol présente une conductivité électrique élevée et une valeur de pH entre 8.1 et 9, ce permet de le qualifier de sol très salé et alcalin.

En ce qui concerne l'isolement des bactéries halotolérantes à partir du sol, un total de 15 isolats a été caractérisé phénotypiquement. Ces isolats ont montré une aptitude à croître à différentes gammes de températures, de pH et de salinité. Huit isolats (S1, S12, S3, S4, S5, S6, S7 et S8) ont montré une aptitude à croître à 50 °C avec une croissance maximale à cette température, qui pourrait correspondre à leur température optimale de croissance. Néanmoins, tous les isolats ont pu croître à 30, 40 et 50 °C. En ce qui concerne le pH, l'ensemble des souches ont la capacité de croître à un pH de 5 et 9. Les souches S1, S2, S3, S4, S5, S9, S13 et S15 ont montré une croissance maximale à pH 9, tandis que les souches S6, S7, S8, S10, S11, S12 et S14 ont montré une croissance maximale à pH 5. De plus, les résultats obtenus démontrent que l'ensemble des souches isolées sont halotolérantes car elles ont la capacité de croître à des concentrations de 5 et 7 % de NaCl. Les isolats S1, S2, S4, S6, S7, S8, S11, S12, S13, S14 et S15 ont montré une croissance optimale à une concentration de 7 % de NaCl.

Par ailleurs, l'ensemble des souches isolées sont aéro-anaérobies facultatives et arborent une importante diversité métabolique. En outre, le criblage enzymatique a montré la grande capacité des souches S1 et S2 à produire une amylase, une cellulase, une lécithinase, une caséinase et une lipase, témoignant de la présence d'une diversité enzymatique importante.

Ces résultats montrent que le sol des sebkhas constitue une bonne source pour la recherche et l'isolement de nouvelles souches bactériennes productrices d'enzymes, qui pourraient être exploitées pour des applications biotechnologiques.

Cette étude constitue un travail préliminaire, il serait donc intéressant de le poursuivre et le compléter en :

- Identifiant les souches isolées par des techniques moléculaires ;
- Testant l'aptitude de ces isolats à produire des composés antibactériens et antifongiques;
- Testant l'aptitude de ces isolats à synthétiser d'autres enzymes dégradant la pectine, la lignine, la chitine, les hydrocarbures et les pesticides ;
- Caractérisant et identifiant les enzymes produites par ces isolats ;
- Réalisant une étude plus approfondie de la diversité microbiologique de ce sol (archées et champignons filamenteux) ;
- Rétudiant cet écosystème en utilisant pour l'isolement d'autres milieux de culture et d'autres conditions, afin d'isoler le maximum de souches et cibler des métabolismes beaucoup plus spécifiques.



**Références
bibliographiques**

A

- **Aibeche, C., Sidhoum, W., Djabeur, W., Kaid-Harche, M. (2020).** Effet des caractéristiques physico-chimiques sur la charge microbienne de l'eau des zones humides du nordouest algérien : cas du lac Télamine et de Dayet Oum Ghellaz, Oran). Algerian Journal of Environmental Science and Technology December edition, December edition. Vol.6. No 4. ISSN: 2437-1114.
- **Arrouays, D., Webb, J., Feller, C., Jolivet, C., Saby, N., Andreux, F., Bernoux, M., Cerri, C. (2003).** Estimation de stocks de carbone organique des sols à différentes échelles d'espace et de temps. *Etude et Gestion des sols*, 10 (4), 347-355.
- **Aubert, G. (1978).** Méthodes d'analyses des sols. 2^{ème} Edition, centre régional de documentation pédagogique. CRDP Marseille.

B

- **Bahi, K., Miara, M.D., Hadjadj-Aoul, S. (2020).** Approche diachronique de la flore des bassins fermés halomorphes de la région d'Oran (NO Algérie). *Bulletin de la Société Royale des Science de l'université de Liège*, vol. 89, p. 147-163.
- **Baize, D. (1988).** Guide des analyses courantes en pédologie. INRA, Paris.
- **Ben Abdellah, A.M. (2014).** Screening de souches extramorphiles halophiles du genre *Bacillus* de la sebkha d'Oran (caractérisation phénotypique). Université de Tlemcen.
- **Ben Abdallah, M., Karray, F., Mhiri, N., Mei, N., Quémeneur, M., Cayol, J.L., Erauso, G., Tholozan, J.L., Alazard, D., Sayadi, S. (2016).** Prokaryotic diversity in a Tunisian hypersaline lake, Chott El Jerid. ORIGINAL PAPER, 20 : 125–138. DOI 10.1007/s00792-015-0805-7.
- **Benziane, A. (2014).** The aquifer system of the Great Sebkh of Oran: Geological and hydrogeological considerations. *Bulletin de l'Institut Scientifique, Rabat, Section Sciences de la Terre*, n° 35, 77-92.
- **Boetius, A., Joye, S. (2009).** Saline environments from polar glaciers to the deep-sea floor contain a surprising variety of organisms. *SCIENCE*, VOL 324, page 1523.
- **Bousid, A., Annab, S., Allaoua, N. (2021).** Evaluation temporelle de la qualité physico-chimique et biologique des zones humides d'Oum El Bouaghi. Mémoire de master. Université Larbi Ben Mhidi Oum El Bouaghi.
- **Boutelli, M. H. (2012).** Salinité des eaux et des sols au niveau de la Sebkh de Bamendil: caractérisation et conséquences sur l'environnement. Mémoire de magistère en aménagement hydraulique dans les milieux arides. Ouargla, p 130.

C

- **Calvet, G., Villenin, P. (1986).** Interprétation des analyses de terre. Ed. SCPA.
- **Cayol, J.L., Olliver, B., Alzard, D., Amils, R., Godfroy, A., Marty, D., Pierre, F., Prieur, D. (2017).** Les conditions de vie extrêmes sur la planète et exobiologie. *Ecologie microbienne*, Pau : PUPPA, 47p. ISBN 2353110223.
- **Chamekh, R., Deniel, F., Donot, C., Jany, J.L., Nodet, P., Belabid, L. (2019).** Isolation, Identification and Enzymatic Activity of Halotolerant and Halophilic Fungi

from the Great Sebkhha of Oran in North western of Algeria. Mycobiology, 47:2, 230-241, DOI: 10.1080/12298093.2019.1623979.

- **Craaq. (2003).** Guide référence en fertilisation, 1^{ère} édition : troisième mise à jour (août 2008).
- **Cui, H.L., Dyll-Smith, M.L. (2021).** Cultivation of halophilic archaea (class *Halobacteria*) from thalassohaline and athalassohaline environments. Mar Life Science Technology, 3, 246-251, DOI : <https://doi.org/10.1007/s42995-020-00087-3>.
- **Cayol, J.L. (1995).** Etude de bactéries anaérobies strictes isolées d'environnements extrêmes: exemple de milieux hypersalés ou chauds. Thèse de Doctorat. France : Université de Provence Aix-Marseille I.

D

- **Daoud, L., Ben Ali, M. (2020).** Halophilic microorganisms: interesting group of extremophiles with important applications in biotechnology and environment. Elsevier, 51-64.
- **DasSarma, S., DasSarma, P. (2017).** Halophiles. In: eLS, Wiley Ltd: Chichester, p:1-13.
- **Delgado-Garcia, M., Nicolas, B., Poli, U. N., Aguilar, C. N., Rodriguez-Herrera, R. (2015).** Isolation and Screening of Halophilic Bacteria for Production of Hydrolytic Enzymes. Edition Springer International Suisse, 379-401.
- **Demnati, F., Samraoui, B., Allach, F., Sandoz, A., Ernoul, L. (2017).** Literature review of Algeria an salt lakes: Values, threats, and implication. Environ Earth Science, 76 :127 DOI : 10.1007/s12665-017-6443-x.
- **Didari, M., Bagheri, M., Ali Amoozegar, M., Bouzari, S., Budovaliam, H., Tebyanian, H., Hasanshahian, M., Ventosa, A. (2020).** Diversity of halophilic and halotolerant bacteria in the largest seasonal hypersaline lake (Aran-Bedgol-Iran). Journal of Environmental Health Science and Engineering, DOI: <https://doi.org/10.1007/s40201-020-00519-3>.
- **Dubost, D. (2002).** Aménagement et développement agricole des oasis algériennes. CRSTRA, Biskra. Écologie, p 423.

E

- **Edbeib, M. F., Wahab, R. A., Huyop, F. (2016).** Halophiles: biology, adaptation, and their role in decontamination of hypersaline environments. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 32(8), 135.
- **Fiche descriptive sur les zones humides Ramsar.**
- **Enache, M., G. Teodosiu, T. Itoh, M. Kamekura et H. (2017).** Stan-Lotter. Halophilic microorganisms from man-made and natural hypersaline environments: Physiology, ecology, and Références bibliographiques 149 biotechnological potential. In Adaption of Microbial Life to Environmental Extremes. Springer, p.201-226.

F

- **Faradj Ebdeid, M., Roswanira, A. N., Huyop, F. (2016).** Halophils Biology Adaptation and their Role in Decontamination of Hypersaline Environments. World Journal Microbial Biotechnol, 32:135. DOI 10.1007/s11274-016-2081-9.
- **Fiche descriptive sur les zones humides Ramsar.**
- **Fol, E. (2008).** Comment se forment les sebkhas. S.V.T. Monde.

G

- **Gouasmia, G., Amarouayache, M., Frihi, H., Kara, M.H. (2016).** Caractérisation physico-chimique de trois lacs salés permanents de la vallée d'Oued Righ (sahara septentrional, Algérie Nord-Est). Revue d'Ecologie (Terre et Vie), vol. 71 (4), 330-341.
- **Guittoum, A. (2017).** Relation entre les fractions granulométrique et la conductivité électrique cas de sebkha Melloul willaya de Sétif. Doctorat dissertation. Université de Sétif.
- **Gunde-Cimerman, N., Plemenitaš, A., Oren, A. (2018).** Strategies of adaptation of microorganisms of the three domains of life to high salt concentrations. FEMS Microbiology Reviews, Vol. 42 (3), 353-375.

K

- **Khallef, S. (2019).** Etude de la Flore bactérienne halophile cultivable des zones humides de Ouargla (Algérie). These de doctorat. Université de MOULOUD Mammeri de TIZI-OUZOU.

L

- **Landolsi, S., Rajeb, H. (2021).** Milieux aquatiques et urbanisation : La Sebkha de Moknine. ResearchGate, p 20-25.
- **Lewinson, O., Padan, E., Bibi, E. (2004).** Alkalitolerance: a biological function for a multidrug transporter in pH homeostasis. Proceedings of the National Academy of Sciences, 101 (39), 14073-14078.

M

- **Miaer, R. M., Pepper, I.L., Gerba, C.P. (2000).** Environmental microbiology, Microorganisms in surface soils. In. Academic press. A Harcourt science and technology company. Canada, p. 79-82.
- **Mediani, M.S. (2016).** Etude sédimentologique de la sédimentation ancienne et actuelle de la cuvette de Sbaa (Sebkha de Sbaa Sahara Occidental, Algérie), Mémoire de Master Université d'Oran, 02, p 80.
- **Menasria, T., Aguilera, M., Hocined, H., Ben Ammara, L., Ayachi, A., Si Bachir, A., Dekak, A., Monteoliva-Sanchez, M. (2018).** Diversity and Bioprospecting of Extremely Halophilic Archaea Isolated from Algerian and Semi-Arid Wetland Ecosystems for Halophilic Active Hydrolytic Enzymes. Microbiological Research, 207, 289–298. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.micres.2017.12.01>.

- **Menasria, T. (2020).** Biodiversité microbienne dans les milieux extrêmes salés du Nord-Est Algérien. Thèse de Doctorat. Université Mustapha Ben Boulaid- Batna 2.
- **Mishellany, A., Delalande, J., Tourenq, C. (1998).** La normalisation des granulats et l'Europe. Bulletin des laboratoires de ponts et chaussées,
- **Moali, A., Remicgi, F.Z. (2009).** Fiche descriptive sur les zones humides Ramsar (FDR)- version 2006-2008.
- **Mohammadipanah, F., Hamedi, J., Dehghani, M. (2015).** Halophilic bacteria: potentials and applications in biotechnology. Development and Biodiversity. Springer International Publishing, Switzerland, 277-321.
- **Mukhtar, S., Malik-Kauser, A., Mehnaz, S. (2020).** Osmoadaptation in Halophilic Bacteria and Archaea. Research Journal of Biotechnology, Vol. 15 (5).

N

- **Nas, F., Aissaoui, N., Mahjoubi, M., Mosbah, A., Arab, M., Abdelwahab, S., Khrouf, R., Masmoudi, A.S., Cherif, A., Klouche-Khelil, N. (2021).** A comparative GC-MS analysis of bioactive secondary metabolites produced by halotolerant *Bacillus* spp. isolated from the Great Sebkh of Oran. International Microbiology, 24 (3), 455-470.

O

- **Olsen, S.R. (1985).** Estimation of available phosphorus in soils by extraction with sodium bicarbonate. Cir.U.S.Dep.Agr. 30 (4), 844-852.
- **Oren, A. (2002).** Diversity of halophilic microorganismes : environments, phylogeny, physiology, and application. Journal. International. Microbiol. Biotechnol, 28, pp.56-63.
- **Oren, A. (2010).** Industrial and environmental applications of halophilic microorganisms. Environ Technol, 31 (8-9), 825-834.
- **Oren, A. (2011).** Diversity of halophiles. Extremophiles handbook, 309-325.

R

- **Roger, P., Garcia, J.I. (2011).** Introduction à la microbiologie du sol. Acad. Press Inc, 15-32.

S

- **Sabai, A., Massuel, S., Riaux, J., Tarhouni, J., Leduc, C. (2015).** Étude socio-hydrologique de la sebkha Kelbia en Tunisie centrale : évolution de la ressource en eau et trajectoires d'adaptations aux changements globaux. ResearchGate.
- **Saibi, A.N.E., Nas, F., Arab, M., Aissaoui, N., Boykeroui, Y., Klouche-Khelil, N. (2002).** Antimicrobial and Enzymatic Profiling of Oran, Northwestern Algeria, Geomicrobiology Journal, 39 :9, 816-831, DOI : <http://10.1080/01490451.2022.209777>.
- **Sahli, K. (2021).** Etude des archaea halophiles extrêmes isolées d'environnements hypersalins algériens et caractérisation de leurs caroténoïdes. Thèse de Doctorat. Université Frères MENTOURI de Constantine1, DOI : <http://193.194.84.124/thèses/agronomie/SAH7697.pdf>.

- **Samraoui, B., Samraoui, M. (2008).** An ornithological survey of Algerian Wetlands: Important Bird Areas, Ramsae siteq and threatened species. *Wildfowl*, 58 :71-96.
- **Seck, E. H., Dufour, J. C., Raoul, D., Lagier, J. C. (2018).** Halophilic et Halotolerant Prokaryotes in Humans. *Future Microbiology*, 10.2217/fmb-2017-0237. ISSN 1746-0913.
- **Singh, S., Sran, K.S., Pinnaka, A.K., Roy Choudhury, A. (2019).** Purification, characterization and functional properties of exopolysaccharide from a novel halophilic *Natronotalea sambharensis* sp. nov. *International Journal of Biological Macromolecules*, DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814849-5.00018-6>.
- **Squillaci, G., Parrella, R., Carbone, V., Minasi, P., La Cara, F., Morana, A. (2017).** Carotenoids from the extreme halophilic archaeon *Haloterrigena turkmenica*: Identification and antioxidant activity. *Extremophiles*, 21(5), 933-945.

T

- **Thiam, A., Samba, S.A.N., Noba, K., Ndiaye, J.P., Diatta, M., Wade, M. (2015).** Etude de la variation de la végétation en milieux salé et acide au Sénégal. *International Journal. Biology. Chemistry. Science*, 9 (1) : 155-175.

V

- **Ventosa, A., Haba, R. R., Sanchez-Peno, C., Papke, R. T. (2015).** Microbial Diversity of Hypersaline Anvironments: a Metagenomic Approach. *Current Opinion in Microbiology*, 25:80–87.
- **Verma, A., Kumar, S., Mehta, P. (2020).** Physiological and Genomic Perspective of Halophiles Among Diffrent Salt Concentrations. Elsevier Inc. All rights reserved, DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818322-9.00011-3>.

W

- **Wild, A. (1993).** Soiles and environnement. An introduction. In *Cambridge priceeditions*. Campridge University press, Campridge, 36 (3), 619-630.

Y

- **Yan, J.P., Hinderer, M., Einsele, G. (2001).** Geochemical evolution of closed-basin lakes: general model and application to Lakes Qinghai and Turkana. *Sedimentary Geology*, 148, 105-122.

Z

- **Zeghoud, D. (2020).** *Tourisme en Algérie*. Wordpress.
- **Zitouni, R., Meguedmi, D. (2021).** Relation entre les fractions granulométriques et la conductivités électriques cas de sebkha Melloul wilaya de Sétif. *Mémoire de mastère*. Université Mohamed El Bachir El Ibrahimy- B.B.A.



Annexes

Annexe 01 : Matériel

❖ Appareillage

Balance de précision, Plaque chauffante, Etuve, Agitateur à barreau magnétique, Spectrophotomètre, Loupe Binoculaire, Microscope optique, Réfrigérateur, Autoclave, Bec Bunsen, Vortex, Bain Marie, tamis en plusieurs dimension de maille, pH mètre, Conductivimètre, Calcimètre, Ampoule, Plaque chauffante, Four, Dessiccateur.

❖ Verrerie de laboratoire

Boîtes de Pétri, Bêchers, Pipettes Pasteur, Erlenmeyers, Tubes à essai, Lames et Lamelles, Micropipette 1000 µL, Micropipette 100 µL, Pipettes, Poire, Cuves, Portoires, Papier absorbant, Papier aluminium, Flacons, Cryotubes, Papier film transparent, Pissette, Pince en bois, Récipients, Portoires, Navettes, Spatule, Bandelette, Cuves, Eprouvettes, Matras de Kjeldhal, Fiole jaugée, Papier filtre, Capsule en porcelaine.

❖ Produits chimiques

Eau Distillé, Eau Physiologique, Eau Peptonée tamponnée, Eau de javel, Ethanol 96 °C, Huile d'immersion, Colorants pour la coloration de Gram : (Fushine, Violet de Gentiane, Lugol), Rouge Congo, NR1, NR2, Poudre de Zinc, VP1, VP2, Kovacs, Tween 80, HCl, NaOH CaCl₂, K₂Cr₂O₇, H₂SO₄, FeSO₄, CaCO₃, BaCl₂, Oxalate d'ammonium, Permanganate, Méthyle orange, Chromate de potassium, Nitrate d'argent, Chlorure de sodium, Acide phosphorique, Acide sulfurique, Acide borique (2 %), Acide chlorhydrique, acide ascorbique, réactif Sulfomolybdique, Indicateur à la diphénylamine, Phénolphtaléine, catalyseur.

Annexe 02 : Composition des milieux de culture

Tableau 01 : Composition de chaque milieu de culture.

Milieu Composant	ISP1	ISP2	Bennett	Luria Bertani
Tryptone	5 g	/	/	10 g
Peptone	/	/	2 g	/
Extrait de levure	3 g	4 g	2 g	5 g
Agar	15 g	10 g	20 g	15 g
Glucose	/	4 g	10 g	/
NaCl	/	/	/	10 g
Extrait de malt	/	10 g	/	/
Extrait de viande	/	/	1 g	/
Qsp Eau distillée	1000 mL	1000 mL	1000 mL	1000 mL
pH	7.2	7.2	7.2	7.2

Bouillon nutritif : 28 g de poudre pour 1000 mL d'eau distillée.

Gélose nutritive : 28 g de poudre pour 1000 mL d'eau distillée.

Annexe 03 : Observation macroscopique des isolats

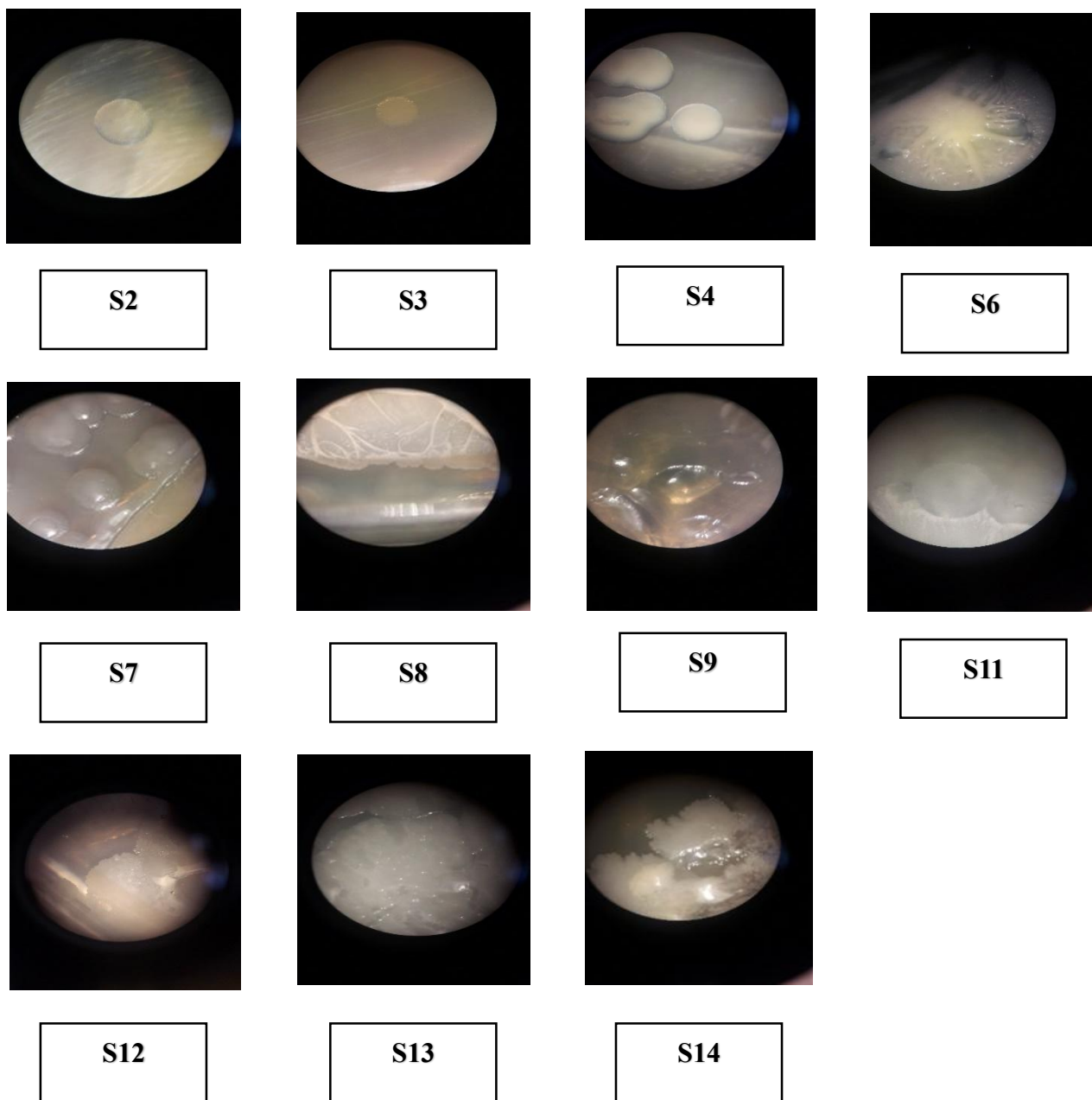


Figure 01 : Observation macroscopique des restes des isolats.

Les environnements salins, tels que les Sebkhass, sont une source prometteuse de bactéries capables de produire des molécules naturelles intéressantes. Dans cette étude, nous nous sommes intéressés dans un premier temps à l'étude pédologique du sol d'une sebkha située dans le Nord-Ouest algérien, et dans un second temps à l'isolement et la purification de souches bactériennes halotolérantes à partir de ce même sol. Un criblage enzymatique ainsi qu'une étude des caractères physiologiques des différents isolats (température, pH et salinité) ont été également réalisés.

Les analyses physico-chimiques du sol ont révélé après mesure de la conductivité et du pH, que le sol analysé est très salin et alcalin. En outre, ces analyses ont montré une absence totale des chlorures, des carbonates et des bicarbonates avec de faibles concentrations en carbone organique, en matière organique, en azote et en phosphore, ainsi qu'une prédominance de calcaire et sulfate.

En ce qui concerne l'analyse bactériologique, 15 souches bactériennes ont été isolées à partir de cet échantillon de sol. Les souches isolées sont caractérisées par une diversité morphologique, métabolique et enzymatique remarquable. En effet, l'ensemble des isolats ont montré une aptitude à croître à différentes gammes de température (30, 40 et 50 °C), de pH (5 et 9) et de salinité (5 et 7 % de NaCl). De plus, le criblage d'enzymes extracellulaires a montré que les enzymes, caséinase, lécithinase et lipase, sont les plus produites. Par ailleurs, les souches S1, S2, S8, S10 et S13 sont capables de produire toutes les enzymes recherchées (amylase, cellulase, caséinase, lécithinase et lipase).

Ces résultats montrent que le sol de cette sebkha constitue une bonne source pour la recherche et l'isolement de nouvelles souches bactériennes productrices d'enzymes, qui pourraient être exploitées pour des applications biotechnologiques.

Mots clés : Environnements hypersalins, Sebkhass, Bactéries halotolérantes, Stress salin, Enzymes.

Abstract

Saline environments, such as the Sebkhass, are a promising source of bacteria capable of producing interesting natural molecules. In this study, we were initially interested in the pedological study of the soil of a sebkha located in northwestern Algeria, and secondly in the isolation and purification of halotolerant bacterial strains from this same soil. Enzymatic screening as well as a study of the physiological characters of the different isolates (temperature, pH and salinity) were also carried out.

The physico-chemical analyzes of the soil have revealed, after measuring the conductivity and the pH, that the soil analyzed is very saline and alkaline. In addition, these analyzes showed a total absence of chlorides, carbonates and bicarbonates with low concentrations of organic carbon, organic matter, nitrogen and phosphorus, as well as a predominance of limestone and sulphate.

Regarding the bacteriological analysis, 15 bacterial strains were isolated from this soil sample. The isolated strains are characterized by remarkable morphological, metabolic and enzymatic diversity. Indeed, all the isolates showed an ability to grow at different temperature ranges (30, 40 and 50 °C.), pH (5 and 9) and salinity (5 and 7 % NaCl). In addition, the screening of extracellular enzymes showed that the enzymes, caseinase, lecithinase, and lipase are the most produced. Furthermore, the S1, S2, S8, S10 and S13 strains are capable of producing all the desired enzymes (amylase, cellulase, caseinase, lecithinase and lipase).

These results show that the soil of this sebkha is a good source for research and isolation of new enzyme-producing bacterial strains, which could be exploited for biotechnological applications.

Keywords : Hypersaline environments, Sebkhass, Halotolerant bacteria, Salt stress, Enzymes.