

ETUDE COMPARATIVE PAR EPIFLUORESCENCE ET CYTOMETRIE EN FLUX DES COMMUNAUTES BACTERIENNES DES EAUX DE LA RETENUE DU BARRAGE SIDI SALEM (TUNISIE SEPTENTRIONALE)

Samira BEN ROMDHANE^{1,2}, M. ELBOUR², A.HAMZA² et M. M. KRAIEM²

1: Faculté des Sciences de Tunis, Tunisie, 2: Institut National des Sciences et Technologies de la Mer (INSTM)-Tunisie

samirabenromdhane@yahoo.fr

□ □ □

دراسة مقارنة المجموعات البكتيرية المتواجدة ببحيرة سد سيدي سالم (البحيرة الشمالية) باستخدام المجهر épifluorescence : تهدف هذه الدراسة، تقييم التغير المكاني والزمني للمجموعات الجرثومية أساسا (البكتيريا) في بحيرة سد سيدي سالم. مع الأخذ بعين الاعتبار تأثير العوامل البيئية (الشفافية، الأوكسجين والمواد المغذية). وقعت المتابعة الشهرية على مداد سنتين (من فيفري 2009 إلى 2011) لعينات المياه من المصب ومن وسط برج تجمع المياه في البحيرة. وقد تم تحليل وفرة وتوزيع البكتيريا عن طريق الاستخدام المشترك للمجهر والتدفق الخلوي. أظهرت النتائج المتحصل عليها بالمجهر، الكشف عن جميع أنواع البكتيريا (الحية التي لا يمكن تربيتها اصطناعيا)، فكانت النسب تتراوح بين $10^4 \times 5,3$ و $10^6 \times 1,2$ خلية/لتر. وتم تسجيل بلوغ كثافة البكتيريا المتواجدة في العينات المأخوذة من وسط خزان السد، مستوياتها القصوى في فترة الخريف وفي فترة الربيع 2010. كذلك أظهر تحليل العينات المأخوذة من منبع السد، نسبة كثافة عالية للبكتيريا، التي بدورها وصلت إلى أعلى درجاتها في الفترة الشتوية لسنة 2010، مقارنة بالعينات التي أخذت من المصب، لكن تميزت هذه الأخيرة بعلاقة هامة بين مجموعات البكتيريا وبعض العوامل الفيزيوكيميائية (الأكسجين، مجموع النيتروجين و الـ "LDNA"). بعد تحليل مجموعات البكتيريا بطريقة التدفق الخلوي تمكننا من ملاحظة تباعد واضح بين LDNA و HDNA. $10^5 \times 1,3$ و $10^7 \times 4$ خلية/لتر و $10^4 \times 6$ و $10^7 \times 2$ خلية/لتر. يبين هذا البحث أنه يمكن دراسة توزيع مختلف المجموعات البكتيرية وتعدادها بطريقتين، ومدى ارتباطها بأهم العوامل الفيزيوكيميائية حتى يتسنى تقدير و لأول مرة، أهمية التنوع البيولوجي و البيئي للمجموعات الجرثومية وخاصة منها البكتيرية لبحيرة سد سيدي سالم.

المفاتيح: بحيرة سد سيدي سالم، بكتيريا، المجهر épifluorescence، LDNA، HDNA.

RESUME

Deux techniques de comptage par microscopie en épifluorescence et par cytométrie en flux ont été utilisées pour évaluer la variabilité spatio-temporelle des communautés bactériennes dans les eaux de la retenue du barrage Sidi Salem. Ceci, concerne les populations hétérotrophes englobant les formes cultivables et les formes viables non cultivables (VNC) en tenant compte de l'influence des paramètres du milieu (température, transparence, oxygène dissous et sels nutritifs). Ainsi, un suivi mensuel a été établi pendant deux ans (de février 2009 jusqu'à janvier 2011), pour analyser des échantillons d'eau prélevés en amont, en aval et dans la tour de prise de la retenue. Les résultats obtenus montrent que l'observation en épifluorescence révèle toutes les formes bactériennes viables non cultivables, dont l'abondance se situe entre $5,3 \times 10^4$ et $1,2 \times 10^6$ cell/ml. Aussi, nous avons enregistré des charges bactériennes maximales en période automnale et printanière notamment au niveau de la tour de prise. Par ailleurs, la charge bactérienne totale en amont de la retenue est plus élevée que celle en aval et présente une corrélation significative avec certains facteurs physico-chimiques (pH, oxygène dissous, azote totale et chlorophylle a).

Pour l'analyse en cytométrie, les populations bactériennes sont séparées selon l'état de l'ADN en « Low DNA » (LDNA) et « High DNA » (HDNA) avec des abondances respectives variant entre $1,3 \times 10^5$ et 4×10^7 cell/ml et 6×10^4 à 2×10^7 cell/ml. Ces résultats soulignent la grande diversité bactérienne présente dans la retenue du barrage Sidi Salem en fonction des caractéristiques environnementales.

Mots clés : La retenue du barrage Sidi Salem, bactéries, microscope en épifluorescence, cytomètre en flux

ABSTRACT

Comparative study with epifluorescence microscopy and flow cytometry of the bacterial communities of water retention of the Sidi Salem dam (North of Tunisia) : Two counting techniques by epifluorescence microscopy and flow cytometry were used to assess the spatial and temporal variability of bacterial communities in the Sidi Salem reservoir. This concerned the heterotrophic populations, including the cultivable forms and viable non cultivable (VNC) once; taking into account the influence of environmental parameters (temperature, transparency, dissolved oxygen and nutrients). Thus, a monthly monitoring has been followed during two years (February 2009 to January 2011), to analyze water samples upstream, downstream and into the deepest area of the reservoir. The results show that the observation by epifluorescence microscopy reveals all viable non-

cultivable forms of bacteria, including their abundance ranges from 5.3×10^4 to 1.2×10^6 cells / ml. Also, we recorded the maximum bacterial loads during autumn and spring, especially at the deepest station of the reservoir. Otherwise, bacterial loads upstream of the reservoir are higher than those of downstream and significantly correlated with some physico-chemical factors (pH, dissolved oxygen, total nitrogen and chlorophyll a).

For cytometric analysis, bacterial populations are separated according to the state of the DNA "Low DNA" (LDNA) and "High DNA" (HDNA) with respective abundance ranging between 1.3×10^5 and 4×10^7 cells / ml and from 6×10^4 to 2×10^7 cells / ml. These results emphasize the high bacterial diversity in the Sidi Salem dam based on the environmental characteristics.

Key words: Retention of Sidi Salem dam, bacteria, epifluorescence microscopy, flow cytometer

INTRODUCTION

Dans les écosystèmes aquatiques, les bactéries occupent une grande place au niveau des communautés planctoniques, tant par leur grand nombre que par leurs différents rôles. Un premier rôle joué par les bactéries est celui de leur participation à la chaîne trophique microbienne, (c'est-à-dire qu'elles utilisent et décomposent la matière organique présente dans les milieux aquatiques en la minéralisant en biomasse microbienne, tout en transformant une partie de cette matière organique en CO_2 respiré (Bianchi *et al.*, 2003)). D'autre part, les bactéries participent au cycle biogéochimique en libérant des nutriments inorganiques (Jaspers *et al.*, 2001). Finalement, les bactéries participent à la respiration et ont donc une influence sur la production du carbone dans le milieu (Smith, 1998; Gonzalez *et al.*, 2003). Dans la flore bactérienne totale on distingue : les bactéries viables et actives qui jouent un rôle dans la production de biomasse, les bactéries viables et inactives qui peuvent jouer un rôle dans la production bactérienne future et finalement les cellules mortes qui ne sont pas actives et qui sont prêtes à être décomposées (Bernard *et al.*, 2001). Plusieurs facteurs environnementaux et biologiques ont une influence sur les bactéries en termes de croissance, d'activité et de composition. Il existe plusieurs facteurs physico-chimiques qui peuvent agir sur la matière organique pour la transformer en biomasse (Bianchi *et al.*, 2003). L'écologie microbienne a connu un progrès considérable grâce à l'évolution des techniques de dénombrement direct, notamment la technique de comptage bactérien par microscopie en épifluorescence. Bien que très performante pour le dénombrement des bactéries viables dans les milieux aquatiques, cette technique est limitée comparée à la cytométrie en flux qui peut être utilisée pour l'analyse d'un plus grand nombre d'échantillons et un comptage spécifique du nombre et de l'état cellulaire.

L'objectif de ce travail est l'évaluation de la variabilité spatio-temporelle des communautés microbiennes essentiellement (les bactéries hétérotrophes) englobant les formes viables cultivables ou non cultivables (VNC), en tenant

compte de l'influence des paramètres du milieu (température, transparence, oxygène dissous et sels nutritifs) au niveau de la retenue du barrage Sidi Salem.

MATERIELS ET METHODES

1-Site d'étude

La retenue du barrage de Sidi Salem prospectée est localisée sur l'oued Medjerda au Nord ouest de la Tunisie entre Oued Zerga et Testour (Fig. 1). Elle est située dans une région sous climat méditerranéen sub-humide avec des hivers doux (Nabli, 1995). Il s'agit de la retenue la plus importante de la Tunisie avec un bassin versant qui couvre une superficie totale de 18192 Km^2 et un volume de retenue moyen d'environ 485 Mm^3 (Tab.I). Le barrage de Sidi Salem a été construit en 1982, pour des fins agricole, hydroélectrique, alimentation en eau potable et piscicole.

2-Techniques de prélèvement

La récolte des échantillons pour l'analyse bactériologique et des sels nutritifs a été effectuée dans les trois stations suivantes :

* **Station1:** à l'entrée de la retenue (en amont) au niveau de l'oued Medjerda dans la région de Sidi Ismail.

* **Station 2 :** la zone la plus profonde près de la tour de prise (prélèvement en surface de la retenue)

* **Station 3 :** la sortie des eaux du barrage (aval de la retenue).

3-Paramètres physico-chimiques

Pour chaque station, la température ainsi que la salinité et la concentration en oxygène dissous sont mesurées in situ en utilisant une multisonde de terrain de type WTW. Les échantillons pour l'analyse des paramètres chimiques (nitrites, nitrates, ammonium, orthophosphates, l'azote total et le phosphore total) sont conservés à -20°C jusqu'à l'analyse par un auto-analyseur de type 3 (BRAN + LUEBBE) selon le principe de koroleff (1969).

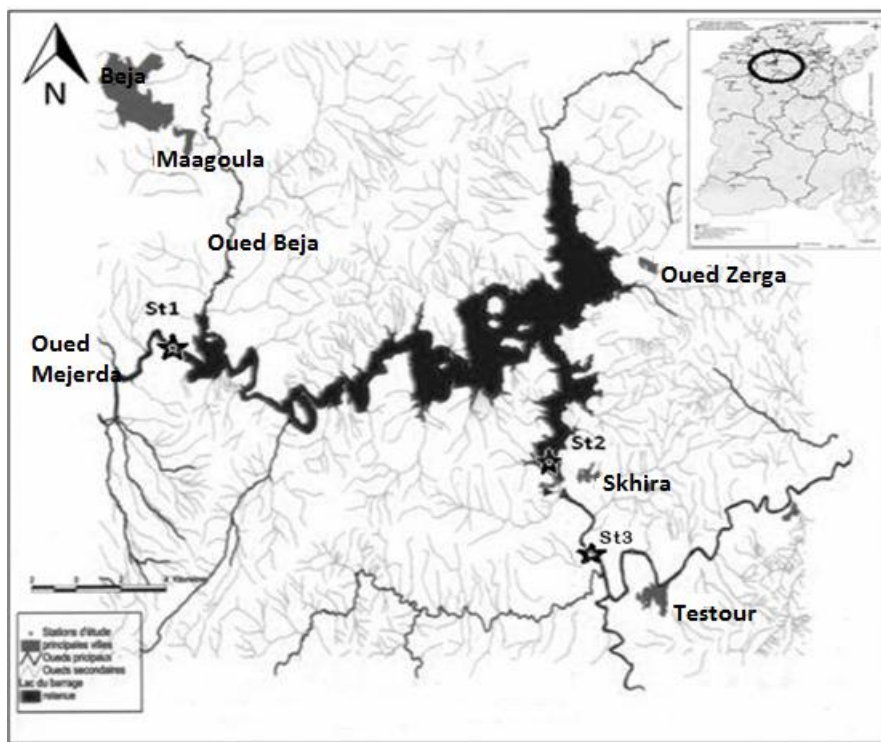


Fig. 1: Situation géographique de la retenue de Sidi Salem et localisation des stations d'étude (St1, St2, St3) (Mouelhi,2000)

Tableau I. Caractéristiques morphométriques et hydrologiques du réservoir de Sidi Salem. (INM et DGBTH, 2011)

	Réservoir de Sidi Salem
Latitude	9°23'34''N
Longitude	36°35'40''E
Construction	1981
Cours d'eau	Oued Medjerda
Superficie de la retenue (ha)	4710
Profondeur maximale (m)	57
Volume (Mm ³)	485
Température moyenne annuelle de l'eau (°C)	18
Moyenne annuelle de précipitation (mm)	450
Moyenne annuelle des apports (Mm ³)	334,3
Moyenne annuelle d'évaporation (mm)	1493,5
Moyenne annuelle d'envasement (Mm ³)	6,8

4-Paramètres microbiennes

Microscopie à épifluorescence

La microscopie optique à épifluorescence a été utilisée pour visualiser les cellules et plus spécifiquement leur matériel nucléaire après excitation par une source lumineuse (laser). Les échantillons analysés sont en général fixés, filtrés sur un filtre en polycarbonate noir à 0.22µm, éventuellement marqués par des fluorochromes (très souvent, le fluorochrome utilisé se fixe au niveau du matériel nucléaire ADN ou ARN comme le DAPI le Di Aminido Phenyl Indol qui est l'exemple choisi) et

montés entre lame et lamelle pour être visualisés en microscopie à épifluorescence.

Cytométrie en Flux

La cytométrie en flux est une technique qui permet de compter individuellement les cellules d'un échantillon en suspension dans un liquide, de discriminer des sous-populations homogènes sur des critères de fluorescence et de taille, et éventuellement de les trier en fonction de leurs propriétés optiques. Le cytomètre en flux se compose de trois parties: une partie fluïdique, une partie optique et une partie électronique/informatique. Cependant, 2 ml de chaque échantillon sont fixés avec du

paraformaldéhyde (2% de concentration finale) pendant 30 min dans l'obscurité, puis l'échantillon est congelé dans l'azote liquide et conservé à -80°C . Les bactéries hétérotrophes ont été comptées en utilisant un cytomètre de flux FACSCalibur (Becton Dickinson) équipé d'un refroidissement par air laser fournissant 15 mW à 488 nm. Avant l'analyse, les échantillons sont décongelés à 37°C , ensuite 5 μl de l'échantillon sont dilués dans 495 μl tampon TE filtré à 0,02 μm (0,1 mM de Tris-HCl et 1 mM d'EDTA, pH 8), et incubée avec SYBR Green I (à une finale 5.10 dilution de la solution commerciale d'achat d'actions; Molecular Probes), pendant 5 min à température ambiante, puis 10 min à 75°C , et 5 min après à la température ambiante, avant l'analyse de la CMF basé sur le protocole de Brussaard (2004) et modifié par Jacquet et *al.* (2013)

RESULTATS

Paramètres physico-chimiques

* Les variations mensuelles des facteurs physico-chimiques durant la période d'étude (Fig.2), montrent une élévation de la température durant la période estivale avec des maxima enregistrés en juillet et août

avec des écarts annuels faibles dans toutes les stations.

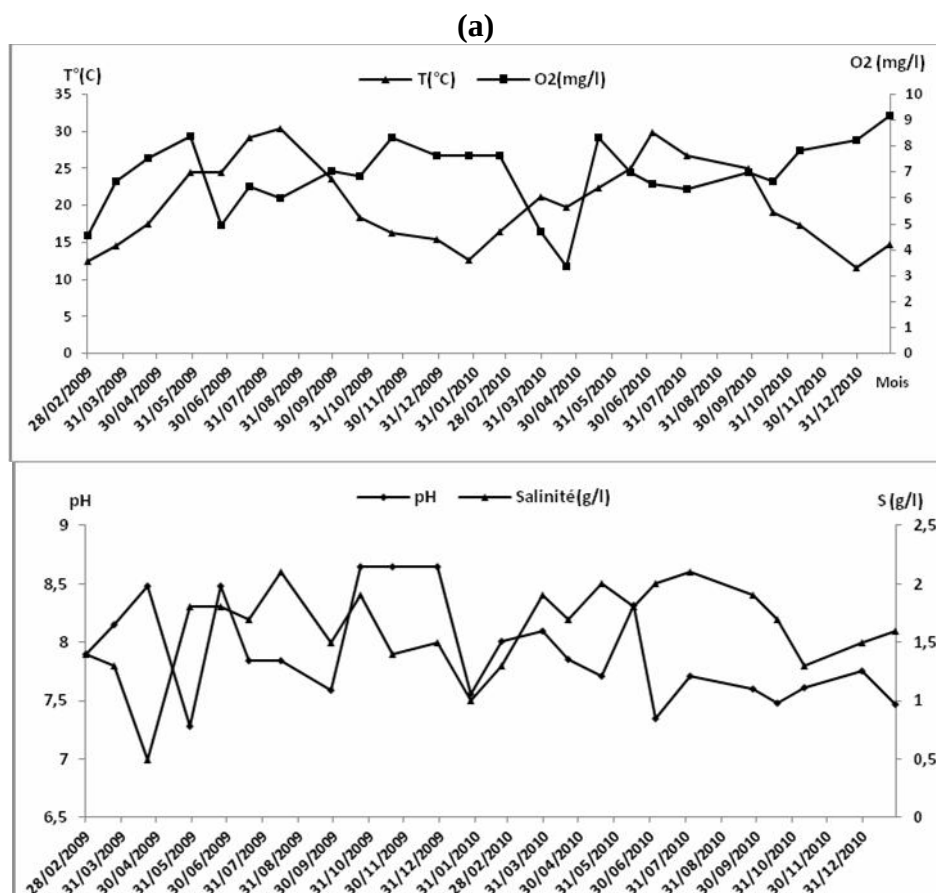
* Les teneurs en salinités sont faibles en période hivernale (l'évolution de ce paramètre dans la retenue est liée à la nature et à la quantité des apports en eaux).

* Pour le pH, les variations entre les stations sont peu importantes, alors que les variations annuelles montrent une augmentation à partir des cycles mars 2009/mars 2010.

*La transparence présente une évolution mensuelle irrégulière et oscille entre les valeurs extrêmes de (0.7m et 3m), mais les variations annuelles révélées sont relativement faibles.

*Les concentrations en oxygène dissous ne montrent pas une grande variation annuelle, mais leurs évolutions mensuelles oscillent entre des maxima marqués surtout en période printanière.

*Une évolution en dents de scie des composés azotés est remarquée dans les différentes stations de prélèvement, les teneurs maximales sont enregistrées en décembre 2010 en amont de la retenue. Les variations mensuelles et annuelles sont très irrégulières.



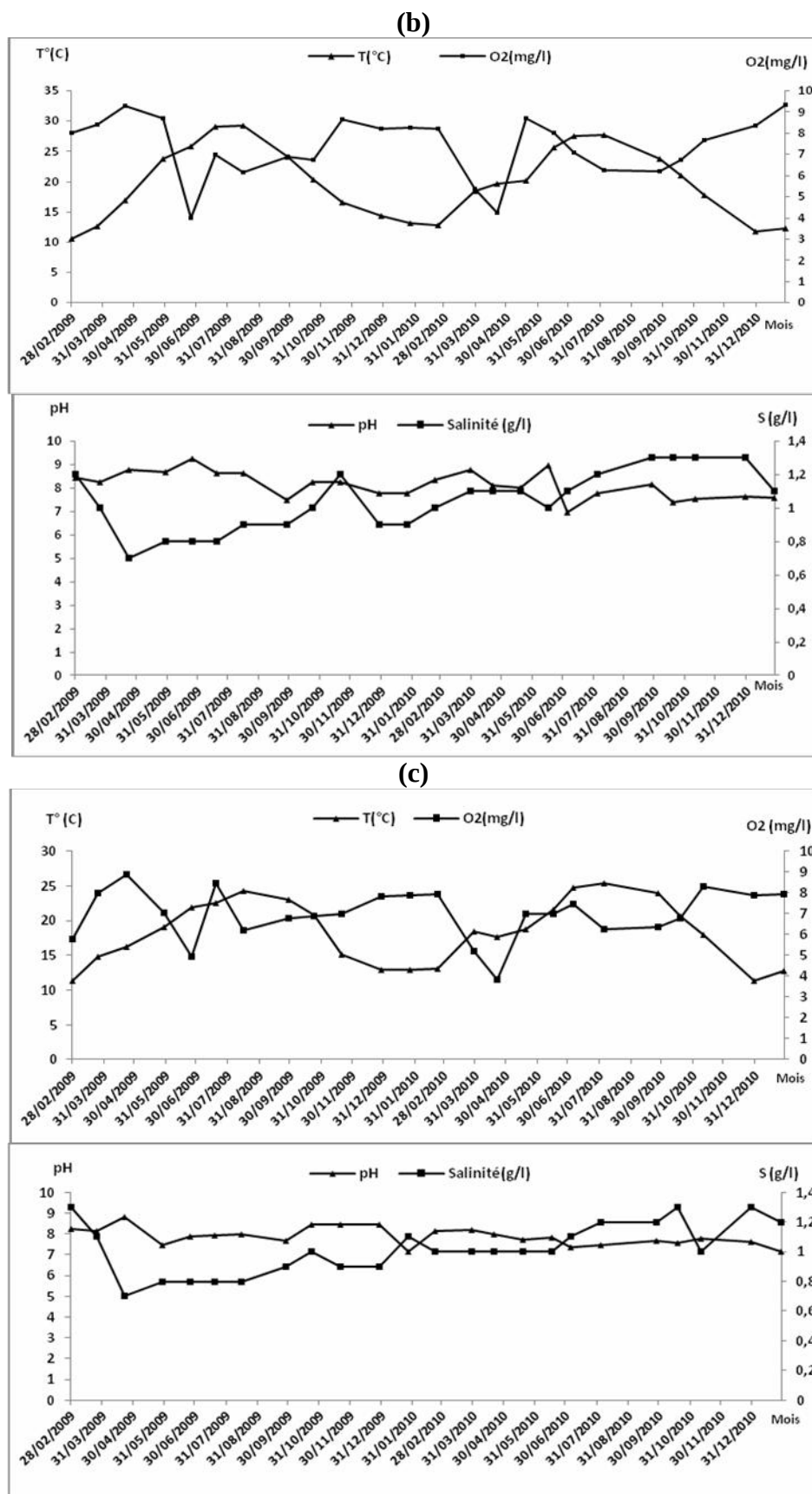


Fig.2: Variations spatio-temporelles des paramètres abiotiques à l'entrée du barrage (amont de la retenue) (a), au niveau de la tour de prise (surface de la retenue) (b), et à la sortie du barrage (aval de la retenue) (c)

* La grande fluctuation des teneurs en azote ammoniacal concordent avec les concentrations basses d'azote total. L'évolution annuelle des teneurs en chlorophylle a est très fluctuante avec des maxima enregistrés surtout en période estivo-automnale qui

peut coïncider avec une forte production algale (Fig.3). Tous ces paramètres caractérisent un état méso-eutrophe de cette retenue selon Ryding et Rast (1994).

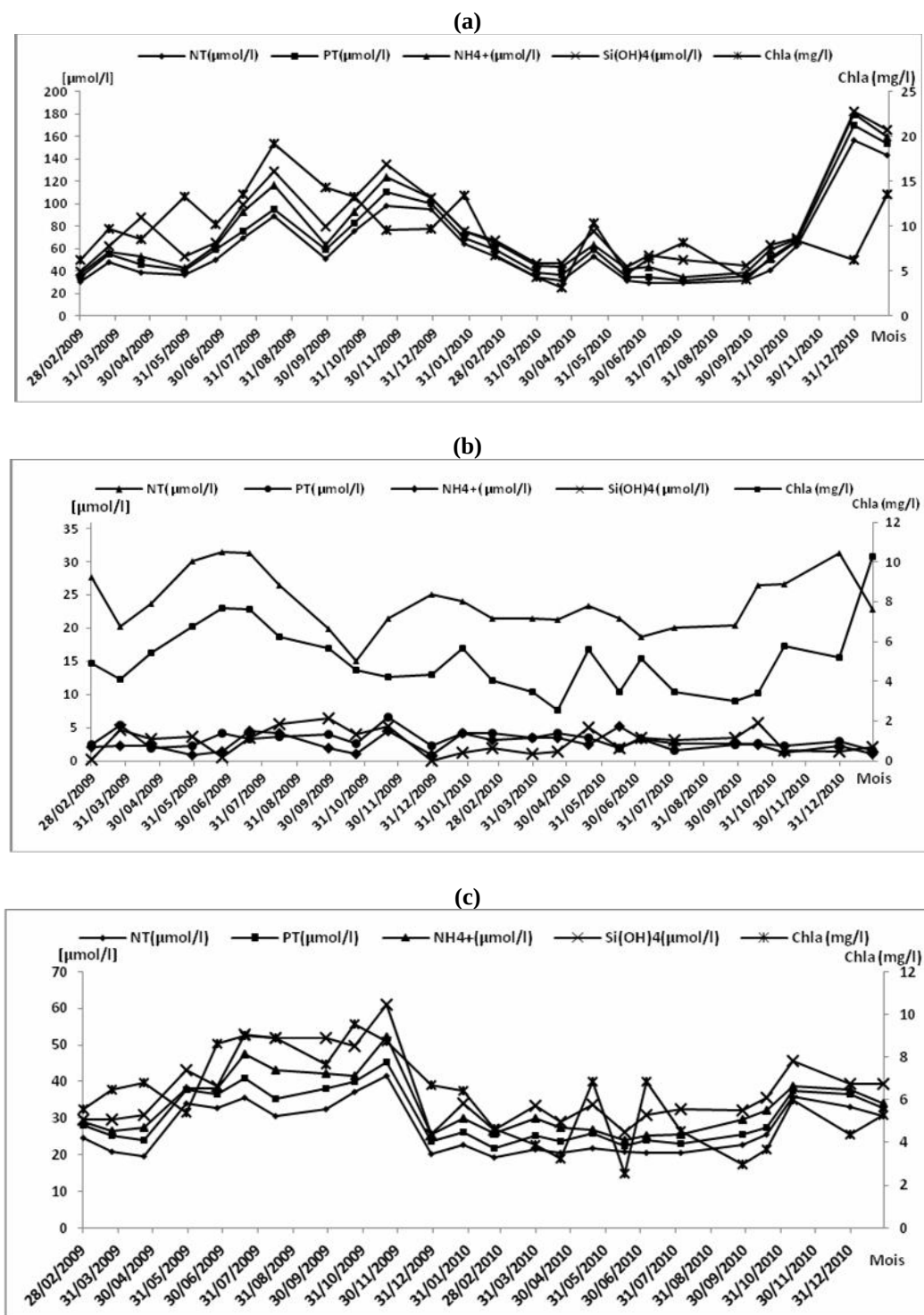


Fig.3: Variations spatio-temporelles des nutriments et de la chlorophylle a à l'entrée du barrage (amont de la retenue) (a), au niveau de la tour de prise (surface de la retenue) (b), et à la sortie du barrage (aval de la retenue) (c)

Analyse microbienne

L'analyse par microscopie en épifluorescence (Fig.4), montre une fluctuation mensuelle importante, et une variation annuelle très irrégulière de la densité bactérienne dans les différentes stations prospectées. La charge bactérienne en amont de la retenue atteint son maximum en période automnale et hivernale, alors qu'en aval et au niveau de la tour de prise les teneurs atteignent leur maximum en période printanière.

En revanche, l'analyse par cytométrie en flux, montre que les bactéries hétérotrophes comptées, gardent le même profil que celui obtenu par épifluorescence, à l'exception des pics estivaux enregistrés en amont et en aval de la retenue. Les concentrations bactériennes non définies enregistrées

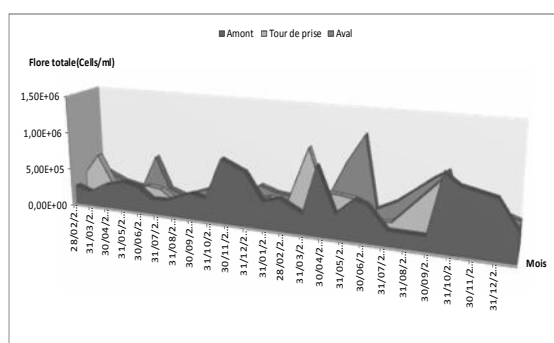


Fig.4: Variations spatio-temporelles de la flore totale dans les différentes stations d'échantillonnage du barrage (par microscopie en épifluorescence)

en amont de la retenue en juillet, août et septembre 2010, n'indiquent pas l'absence des bactéries mais plutôt la charge importante des eaux en matière en suspension à cette période (Fig. 5). Cette méthode nous a permis en plus, d'enregistrer des cytogrammes dévoilant une séparation claire entre les bactéries qui ont une forte affinité pour l'ADN: les (HDNA), et les bactéries qui ont une faible affinité pour l'ADN: les (LDNA). La densité des HDNA est faible au niveau de la tour de prise à l'inverse de ce qui a été enregistré en amont et en aval de la retenue (Fig.6). Les LDNA présentent une forte teneur en aval de la retenue et à la surface au niveau de la tour de prise (où les eaux sont plus transparentes), alors qu'en amont, elles n'ont pas pu être détectées à cause de forte charge des eaux en matières en suspension.

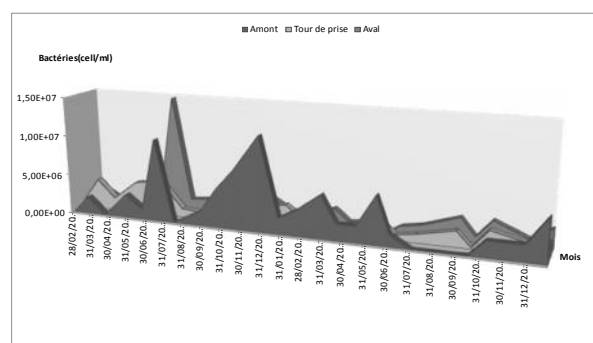


Fig.5: Variations spatio-temporelles des bactéries hétérotrophes dans les différentes stations d'échantillonnage du barrage (par cytométrie en Flux)

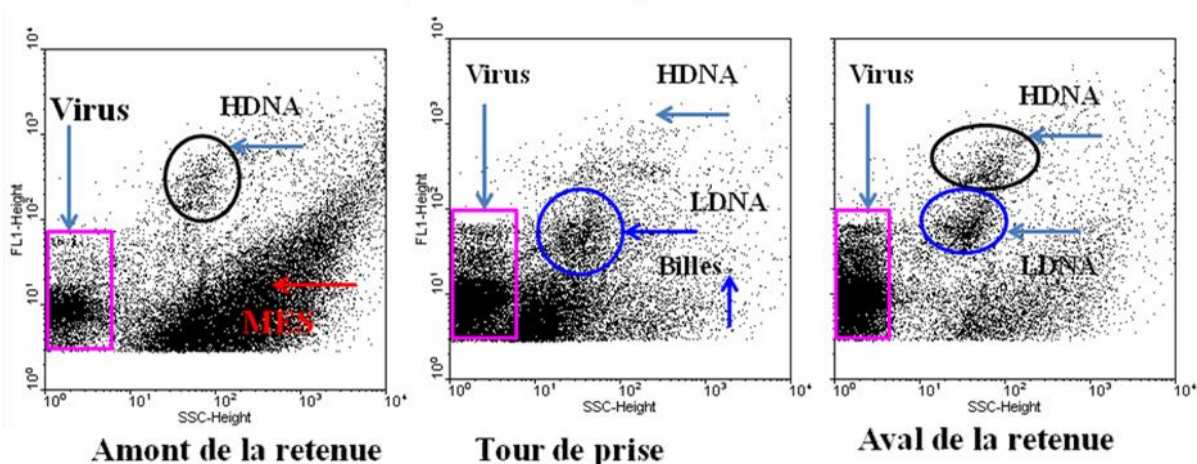


Fig.6 : Cytogrammes montrant la séparation des bactéries HDNA et les LDNA dans les différentes stations de prélèvements

Analyses statistiques

L'analyse des corrélations selon Pearson (Tableau II), a montré des corrélations positives hautement significatives entre les bactéries hétérotrophes et les bactéries LDNA et HDNA en aval et au niveau de la

tour de prise de la retenue ($r=0.96$, $r=0.89$, $r=0.96$, respectivement). Alors que la flore totale ne présente qu'une faible corrélation négative avec la salinité et la chlorophylle a. En amont de la retenue, les LDNA et les HDNA sont très corrélées négativement avec la température du milieu ($r= -0.81$, $r=-0.9$), et

positivement avec l'oxygène dissous ($r=0.88$, $r=0.92$), l'azote total ($r=0.81$, $r=0.88$), et chlorophylle a ($r=0.62$, $r=0.7$). Pour les bactéries hétérotrophes ont une faible corrélation positive ($r=0.5$) avec la chlorophylle a et le pH du milieu, et des faibles corrélations négatives avec l'azote ammoniacal et les

orthophosphates, inversement révélé pour la flore totale.

Au niveau de la zone aval, les charges en bactéries hétérotrophes et leur groupes présentent une faible corrélation positive avec l'azote total, le phosphore total et aussi avec la chlorophylle a.

Tableaux II : Matrices de corrélation (test de Pearson) réalisées avec XL-stat entre les différents variables hydrologiques et bactériologiques dans les différents stations de prélèvement du réservoir Sidi Salem au cours des deux années de suivi (* $p<0.05$; ** $p<0.001$, *** $p<0.0001$)

Amont															
Variables	T°	pH	O2	NO3-	PO43-	NH4+	Nt	Pt	Si	Salinité	Chla	Bacterie	LDNA	HDNA	Flore totale
T°	1	0,201	-0,856	-0,818	-0,849	-0,587	-0,956	-0,828	-0,106	0,890	-0,543	-0,024	-0,819	-0,906	-0,356
pH		1	-0,186	-0,675	-0,457	-0,385	-0,363	-0,673	-0,888	-0,060	-0,149	0,774	0,210	0,105	0,028
O2			1	0,796	0,540	0,164	0,940	0,650	0,325	-0,704	0,860	0,302	0,880	0,929	-0,084
NO3-				1	0,825	0,574	0,921	0,955	0,595	-0,520	0,536	-0,335	0,573	0,644	0,016
PO43-					1	0,913	0,788	0,943	0,153	-0,635	0,107	-0,473	0,508	0,576	0,418
NH4+						1	0,473	0,778	-0,037	-0,390	-0,307	-0,660	0,227	0,257	0,475
Nt							1	0,860	0,347	-0,767	0,686	0,005	0,810	0,887	0,124
Pt								1	0,464	-0,560	0,312	-0,502	0,476	0,563	0,243
Si									1	0,113	0,472	-0,425	-0,133	-0,036	-0,293
Salinité										1	-0,521	-0,234	-0,696	-0,837	-0,625
Chla											1	0,489	0,620	0,706	-0,192
Bacterie												1	0,474	0,423	-0,217
LDNA													1	0,968	-0,067
HDNA														1	0,111
Flore totale															1

Tour de prise (en surface)															
Variables	T°C	secchi	pH	O2	Salinité	Nt	PO43-	NH4+	NO3-	Si	chla	Bacterie	LDNA	HDNA	Flore totale
T°C	1	-0,324	-0,081	-0,523	-0,210	-0,294	-0,367	0,220	-0,348	0,317	0,050	-0,137	-0,123	-0,100	-0,166
secchi		1	-0,053	0,024	0,298	-0,171	0,217	0,167	-0,206	-0,345	-0,441	-0,113	-0,118	-0,166	0,279
pH			1	0,022	-0,498	-0,305	0,005	0,291	-0,422	-0,111	-0,038	0,355	0,160	0,226	0,133
O2				1	0,066	0,136	-0,191	-0,031	0,127	0,204	0,180	0,290	0,213	0,318	-0,105
Salinité					1	0,269	0,085	-0,319	0,276	-0,050	-0,336	-0,173	0,033	-0,169	0,406
Nt						1	0,231	-0,013	0,900	-0,317	0,165	-0,076	0,097	-0,073	-0,222
Po43-							1	-0,371	0,253	-0,267	0,016	-0,077	0,006	-0,177	-0,023
NH4+								1	-0,239	-0,147	0,001	-0,186	-0,162	-0,134	-0,047
NO3-									1	-0,194	0,245	-0,065	0,063	-0,017	-0,254
Si										1	0,467	0,063	0,044	0,173	-0,113
chla											1	-0,008	-0,031	0,091	-0,579
Bacteria												1	0,891	0,962	0,170
LDNA													1	0,860	0,337
HDNA														1	0,101
Flore totale															1

Aval															
Variables	T°	pH	O2	NO3-	PO43-	NH4+	Nt	Pt	Si	Salinité	Chla	Bacterie	LDNA	HDNA	Flore totale
T°	1	-0,088	-0,242	-0,154	-0,244	0,524	0,043	0,139	0,543	-0,241	0,110	0,196	0,064	0,268	-0,292
pH		1	-0,022	-0,043	0,491	0,109	0,029	0,304	-0,071	-0,576	0,389	0,042	0,002	0,075	-0,462
O2			1	0,289	-0,021	-0,157	0,318	0,040	0,108	-0,230	0,413	0,284	0,327	0,261	0,184
NO3-				1	-0,026	-0,333	0,748	-0,401	0,456	0,135	0,353	0,004	0,015	-0,025	0,413
PO43-					1	-0,195	0,033	0,184	0,043	-0,064	0,121	-0,278	-0,345	-0,167	-0,213
NH4+						1	0,187	0,513	0,427	-0,520	0,343	0,384	0,281	0,426	-0,347
Nt							1	0,091	0,647	-0,155	0,624	0,406	0,392	0,448	0,059
Pt								1	0,179	-0,629	0,505	0,379	0,321	0,510	-0,388
Si									1	-0,371	0,608	0,107	-0,011	0,180	-0,042
Salinité										1	-0,658	-0,310	-0,218	-0,313	0,342
Chla											1	0,404	0,319	0,471	-0,228
Bactérie												1	0,967	0,961	-0,056
LDNA													1	0,918	-0,084
HDNA														1	-0,189
Flore totale															1

L'analyse en composantes principales, appliquée à l'ensemble des paramètres abiotiques et biotiques relatifs à la période d'étude (Fig.7), montre que les

deux premiers axes absorbent plus de 78,06 % de la variabilité des paramètres abiotiques et biotiques en amont de la retenue. L'axe F1 absorbant 53,87%

de la variabilité de l'ensemble de paramètres, est corrélé essentiellement avec les variables suivantes : LDNA, HDNA, oxygène dissous et chlorophylle a. L'axe F2 qui absorbe 24,19% de la variabilité des paramètres étudiés est corrélé principalement avec les paramètres biotiques relatifs à l'évolution des bactéries hétérotrophes et le pH du milieu. Par contre, au niveau de la tour de prise de la retenue, les axes 1 et 2 absorbent respectivement 21,50% et 19,09 % de la variation globale. L'axe F1 montre une corrélation entre la charge bactérienne et la chlorophylle a et l'oxygène dissous du milieu. Au niveau de l'aval, la

projection des variables sur le plan factoriel montrent que les deux premiers axes absorbent plus de 50,57% de la variabilité hydrobiologique, avec l'axe F1 expliquant 32,21% de la variabilité de l'ensemble de paramètres, et discrimine essentiellement les paramètres suivants : LDNA, HDNA, bactéries hétérotrophes, oxygène dissous, azote totale et chlorophylle a. L'axe F2 qui absorbe 18,37% de la variabilité des paramètres étudiés est corrélé principalement avec la flore totale et la salinité du milieu.

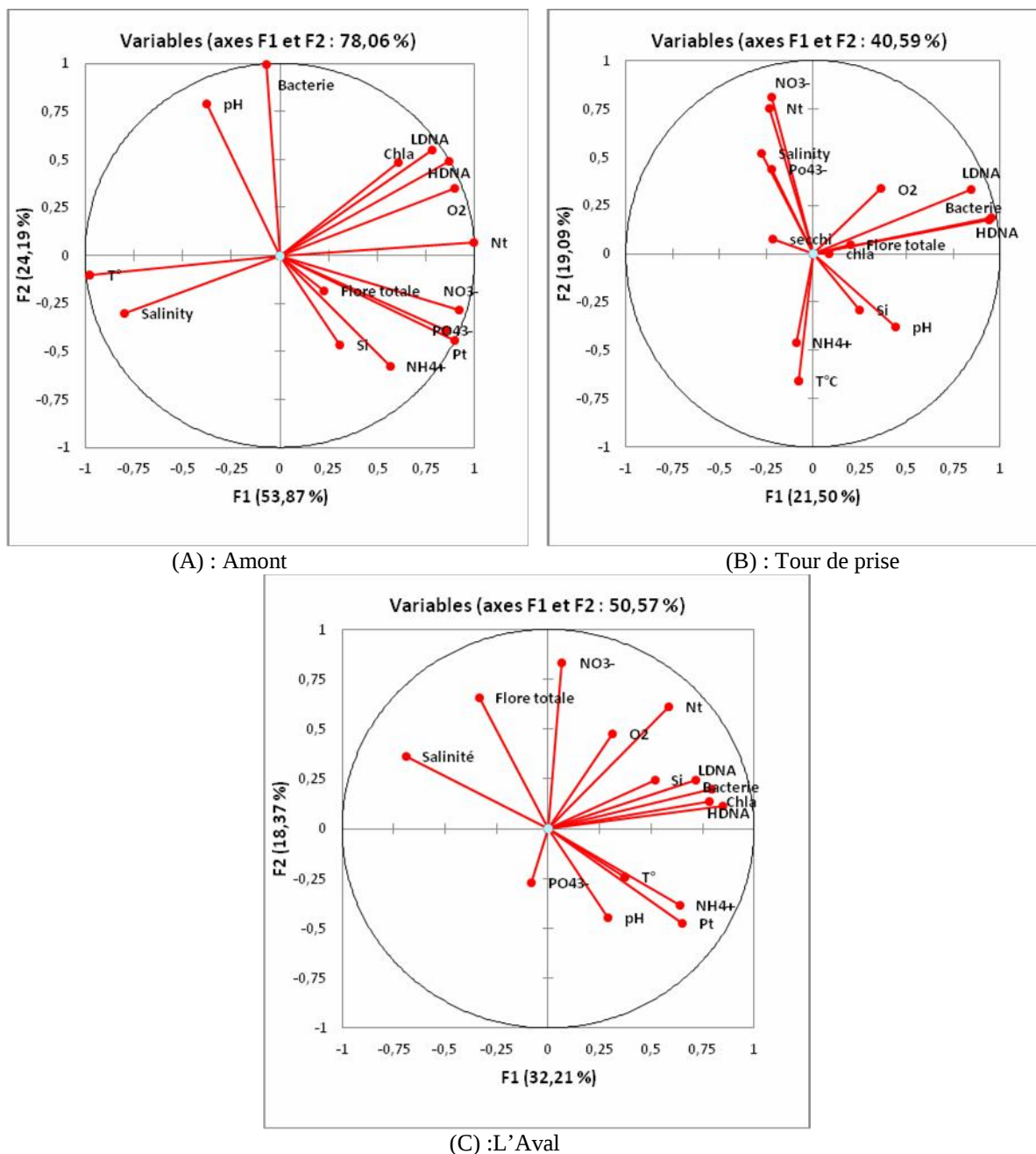


Fig.7 : Analyse en Composante Principale (ACP) des différents variables hydrologiques et bactériologiques dans les différentes stations de prélèvement du réservoir Sidi Salem

CONCLUSIONS ET DISCUSSION

En conclusion, la retenue de Sidi Salem peut être classée dans la gamme des retenues d'eaux douces tempérées, avec une tendance polymictique, à pH alcalin et à salinité faible (1g/l). Son état trophique oscille entre les niveaux mésotrophe et eutrophe qui corroborent les résultats trouvés par Mouelhi (2000). L'évolution des paramètres hydrologiques est principalement régie par le caractère hydrodynamique des eaux du réservoir qui engendre un mélange relativement fréquent. Les fluctuations de la flore bactérienne totale détectée pendant la période d'étude, ont montré une forte charge à tous les niveaux, avec une teneur très importante en période printanière et hivernale, ceci peut être expliqué par la capacité d'adaptation de ces germes et leurs fortes résistances aux différentes conditions de stress du milieu aquatique. Selon Gauthier *et al.* (1990), les bactéries ne meurent pas systématiquement dans l'eau mais peuvent y entrer dans un état de dormance dit « viable mais non cultivable » (forme VNC). Cette situation peut être considérée comme un processus adaptatif répondant à la carence alimentaire. Les populations de bactéries hétérotrophes énumérées par microscopie en épifluorescence et par cytométrie en flux dans les différentes stations de prélèvements montrent des fluctuations importantes et irrégulières durant la période de suivi. Aussi, nous avons pu distinguer par cytométrie en flux, différentes catégories de bactéries hétérotrophes: les HDNA et LDNA, en plus des virus. Les charges bactériennes présentes sont corrélées positivement au pH, à la chlorophylle *a* et à l'azote total, en amont et à la surface de la retenue ce qui dénote un apport anthropique continu dans la retenue. Aussi, une corrélation négative avec la salinité à la surface de la retenue, implique la présence de charges bactériennes non halophiles.

La charge bactérienne atteint son maximum en période automnale et hivernale en amont, au niveau de la tour de prise et en aval de la retenue, ce qui concorde avec les résultats trouvés par Personnic *et al.* (2009), dans le lac d'Annecy. Les bactéries hétérotrophes ont montré une corrélation négative avec la chlorophylle *a*, le même résultat a été obtenu par Zhang *et al.* 2013 à l'estuaire de la rivière des Perles. Cependant, de nombreux chercheurs ont observé une corrélation significative entre les bactéries et chlorophylle *a* dans divers écosystèmes, y compris la baie de Chesapeake (Ducklow *et al.*, 1999), le panache du fleuve Mississippi (Liu *et al.*, 2004), l'estuaire Danshui (Tsai *et al.*, 2011) et le sud de la mer de Chine méridionale (Yuan *et al.*, 2011), indiquant que la production primaire fournit la majorité du carbone nécessaire à la production de bactéries hétérotrophes dans ces milieux. Dans de nombreux environnements estuariens, la relation

entre les bactéries hétérotrophes et la production primaire est faible ou inexistante (Shiah et Ducklow, 1994; Kelley *et al.*, 1998) parce que le carbone organique dissous et la croissance bactérienne dépend surtout d'autres sources phytoplanctoniques non carbonées (Fouilland et Mostajir 2010). La production bactérienne et la chlorophylle *a* se sont avérées significativement plus élevées dans le bassin eutrophes du lac Érié, et de l'Ohio aux Etats-Unis, que dans les bassins les moins productifs (DeBruyn *et al.* 2004). Certains nutriments, plus particulièrement l'azote et le phosphore, limitent la croissance des bactéries hétérotrophes car plus il y aura d'azote et de phosphore disponibles, plus la croissance bactérienne augmentera (Felip *et al.*, 1996; Vadstein *et al.*, 2003). De plus, une température plus élevée engendre une augmentation du métabolisme des bactéries tandis qu'une température plus basse entraîne un ralentissement de leur métabolisme (Felip *et al.* 1996; Addy et Green, 1997). Pour les facteurs biologiques, on retrouve les prédateurs, comme le zooplancton, les flagellés et les ciliés, ainsi que les virus qui correspondent aux bactériophages principaux dans la retenue de Sidi Salem (Ben Romdhane *et al.* 2014).

La présente étude, permet de distinguer deux groupes de bactéries marquées par leur degré fluorescence de leur ADN lors de la coloration avec le Syber green I. Les bactéries à affinité élevée pour l'ADN (HDNA) représentent la fraction active. Les HDNA semblent avoir une contribution se situant entre 77% et 100% de la production bactérienne totale, tout dépendant des milieux, et les LDNA contribuent en moyenne 5 à 20% de la production bactérienne (Lebaron *et al.* 2001; Zubkov *et al.* 2001; Servais *et al.* 2003). Ainsi, les HDNA sembleraient participer à la plus grande partie de la transformation de la matière en biomasse. Les bactéries contenant un taux élevé de (HDNA) sont considérées comme étant les plus actives. De ce fait, les HDNA sont considérées comme étant le groupe dynamique de la communauté bactérienne totale de la chaîne aquatique, compte tenu de leur croissance plus rapide.

La distribution des deux groupes dans cette étude était très semblable, nos résultats sont identiques à ceux présentés par Li & Dickie (2001), qui ont énuméré les bactéries de la surface des eaux côtières au cours des cycles annuels successifs et constatent que les tendances de l'abondance saisonnière étaient très similaires pour les deux groupes.

BIBLIOGRAPHIE

- Addy K. and Green L. 1997-Dissolved oxygen and temperature. *Natural Ressources Facts*. Fact Sheet no. 96-3
- Ben Romdhane S., El Bour.M, Hamza A., Akrou F., Kraiem M.M. and Jacquet S. 2014 Seasonal patterns of viral, microbial and planktonic

- communities in Sidi Salem: A freshwater reservoir (North of Tunisia). *Ann. Limnol. - Int. J. Lim.* 50 : 299–314.
- Bernard L. Courties C., Duperray C., Schäfer H., Muyzer G., and Lebaron P., 2001- A new approach to determine the genetic diversity of viable and active bacteria in aquatic ecosystems. *Cytometry*. 43:314-321
- Bianchi A. Tholosan O., Garcin J., Polychronaky T., Tselepidis A., Buscail R., Duineveld G., 2003. Microbial activities at the benthic boundary layer in the Aegean Sea. *Progress in Oceanography*. 57:219-236
- Brussaard C. P. D., 2004- Optimization of procedures for counting viruses by flow cytometry. *App. and Environ. Microb.* 70. 1506–1513.
- De Byun JM, Leigh-Bell JA, McKay RML, Bourbonniere RA, Wilhelm SW, 2004- Microbial distributions and the impact of phosphorus on bacterial activity in Lake Erie. *Journal of Great Lakes Research* , 30 : 166–183.
- Ducklow, H.W., Schultz, G., Raymond, P., Bauer, J., Shiah, F.K., 1999- Bacterial dynamics in large and small estuaries. In: Bell C. R., Brylinsky, M., Johnson-Green, P. (Eds.). *Microbial ecology of estuaries*. Atlantic Canada Society for Microbial Ecology, Halifax Canada., 105-111
- Felip M., Pace ML. and Cole JJ. 1996- Regulation of planktonic bacterial growth rates: the effects of temperature and resources. *Microbial Ecology*. 31:15-28
- Fouilland, E., Mostajir, B., 2010- Revisited phytoplanktonic carbon dependency of heterotrophic bacteria in freshwater, transitional, coastal and oceanic waters. *FEMS Microbiology Ecology* 73, 419-429.
- Gauthier M.J., G.N. Flatau, R.L. Clément, 1990 - Influence of phosphate ions and alkaline phosphatase activity of cells on survival of *Escherichia coli* in seawater. *Microb. Ecol.*, 20 245-251
- Gonzalez N., Anadon R. et Viesca L.2003. Carbon flux through the microbial community in a temperate sea during summer: role of bacterial metabolism. *Aquatic Microbial Ecology*. 33: 117-126
- Jacquet S., Dorigo U. and Personnic S., 2013- A few tests prior to flow cytometry and epifluorescence analyses of freshwater bacterioand virioplankton communities, in: *Flow Cytometry: Principles, Methodology and Applications*, Chapter 1, Related Nova publication, Nova Publishers Inc., New York, 1–30 p.
- Jaspers E., Nauhaus K., Cypionka H., and Overmann J., 2001- Multitude and temporal variability of ecological niches as indicated by the diversity of cultivated bacterioplankton. *FEMS Microbiology Ecology*. 36: 153-164
- Kelley, C.A., Coffin, R.B., Cifuentes, L.A., 1998- Stable isotope evidence for alternative bacterial carbon sources in the Gulf of Mexico. *Limnology and Oceanography* 43, 1962-1969.
- Koroleff, F., 1969-Direct determination of ammonia in natural waters as indophenol blue. *Information on technique and methods for seawater analysis interlab*. Rep 3: 19-22
- Lebaron P., Servais P., Agogue H., Courties C., Joux F., 2001-Does the high nucleic acid content of individual bacterial cells allow us to discriminate between active cells and inactive cells in aquatic system? *Applied and Environmental Microbiology*. 76:1775-1782
- Li, W. K. W. & P. M. Dickie, 2001-Monitoring phytoplankton, bacterioplankton, and virioplankton in a coastal Inlet (Belford basin) by flow cytometry. *Cytometry* 44: 236–246.
- Liu, H. B., Dagg, M., Campbell L., Urban-Rich, J., 2004.- Picophytoplankton and bacterioplankton in the Mississippi River Plume and its adjacent waters. *Estuaries* 27, 147–156.
- Mouelhi, S., 2000.-Etude écologique de la retenue de Sidi Salem : Aspects physico-chimiques des eaux et dynamique des peuplements zooplanctoniques. Thèse de doctorat en sciences biologiques, université de Tunis II. 289 p.
- Nabli M.H., 1995- Essai de synthèse sur la végétation et la phyto-écologie Tunisiennes. Imprimerie officielle de la République Tunisienne. 542p.
- Personnic S., Domaizon I., Dorigo U., Berdjeb L., and Jacquet S., 2009- Seasonal and spatial variability of virio-, bacterio-, and picophytoplanktonic abundances in three perialpine lakes.– *Hydrobiologia* 627: 99–116
- Ryding S.O., Rast W., 1994.-Le contrôle de l'eutrophisation des lacs et des réservoirs. Collection Sciences de l'environnement. Masson UNESCO Paris. 261p
- Servais P., Casamayor E.O., Courties C., Catala P., Parthuisot N., Lebaron P 2003-Activity and diversity of bacterial cells with high and low nucleic acid content. *Aquatic Microbial Ecology*. 33:41-51
- Shiah, F.K., Ducklow, H.W., 1994.- Temperature regulation of heterotrophic bacterioplankton biomass, production and specific growth rate in the Chesapeake Bay. *Limnology and Oceanography* 39(6), 1243-1258.
- Smith E. 1998 - Coherence of microbial respiration rate and cell-specific bacterial activity in a

- coastal planktonic community. *Aquatic Microbial Ecology*. 16:27-35
- Tsai, A.Y., Gong, G.C., Chiang, K.P., Chao, C.F., Liao, H.K., Shiah, F.K., 2011-Temporal and spatial variations of picoplankton and nanoplankton and short-term variability related to stormy weather in the Danshui River estuary in northern Taiwan. *Terrestrial, Atmospheric and Oceanic Science* 22, 79-89.
- Vadstein, O., Olsen, L.M., Busch, A., Andersen, T. and Reinertsen, H.R.2003- Is phosphorus limitation of planktonic heterotrophic bacteria and accumulation of degradable DOC a normal phenomenon in phosphorus-limited system? A microcosm study. *FEMS Microbiology Ecology*. 46:307-316
- Yuan, X.C., He, L., Yin, K.D., Pan, G., Harrison, P.G., 2011- Bacterial distribution and nutrient limitation in relation to different water masses in the coastal and northwestern South China Sea in late summer. *Continental Shelf Research* 31, 1214-1223.
- Zhang Xia, Zhen Shi, Qingxia Liu, Feng Ye, Lei Tian, Xiaoping Huang ., 2013-Spatial and temporal variations of picoplankton in three contrasting periods in the Pearl River Estuary, South China. *Continental Shelf Research*, 1-40.
- Zubkov M.V, Fuchs B.M., Burkill P. H., and Amann R, 2001-Comparison of cellular and biomass specific activities of dominant bacterioplankton groups in stratified waters of the Celtic Sea. *Applied and Environmental Microbiology*. 67: 5210-5218