Caractérisation de bactéries haloalcaliphiles des depressions salées de Ouargla- Algérie.

Sakina Khallef[1], Roxane Lestini[2], Hannu Myllykallio[2] et Karim Houali[3]

1. *Laboratoire de Génie de l'Eau et de l'Environnement en Milieu Saharien (LGEEMS). Département des Sciences Biologiques, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Kasdi MERBAH d'Ouargla, 30000, Algérie.*

2. *Laboratoire d'Optique et Biosciences (LOB), Ecole Polytechnique, CNRS UMR7645 - INSERM U696.Université Paris-Saclay, 91 128, Palaiseau Cedex, France.*

3. *Laboratoire de Biochimie Analytiques et Biotehnologies (LABAB), Faculté des Sciences Biologiques et des Sciences Agronomiques. Université MMTO Algérie.*

sakina_khallef@yahoo.fr
roxane.lestini@polytechnique.edu
hannu.myllykallio@polytechnique.edu
houalitizi@yahoo.fr

Résumé

Les propriétés physicochimiques des échantillons de saumures prélevés de deux dépressions salées situées à Ouargla, dans le Sahara Algérien ; *Oum Eraneb* et *Ain El Beida*, révèlent la richesse en sel de ses deux sites (128 et 165g /l) respectivement avec une dominance des ions sodium et chlorures. L'exploration microbiologique et phylogénétique a confirmé la présence dans les saumures de l'archée extrême halophile *Natronorubrum bengense A33^T* et de bactérie halotolérante extrême alcaliphile ; *Alkalibacillus haloalkaliphilus* C-5.
Certes identifiée en Chine et en Inde, notre étude est la première à rapporter la présence de ces espèces dans des dépressions salées du Sahara algérien.

Mots clés: Dépression salée, Sahara algérien, Archée, bactérie halophile.

Abstract

The physicochemical proprerties of brine samples taken from two salt depressions located in Ouargla, in the Algerian Sahara, *Oum Eraneb* and *Ain el Beida*, reveal the salt richness of these sites (128 and 165g/l) respectively with dominance of sodium and chloride. Microbiological and phylogenetic explorations confirmed the presence of the extreme archaeal halophilic *Natronorubrum bengense A33^T* and halotolerant extreme alkaliphile bacteria *Alkalibacillus haloalkaliphilus* C-5 in brines.

Already identified in China and India, our study remains the first report of the presence of these species in salt depressions in the Algerian Sahara.

Keywords: Salt depression, Algerian Sahara, Archée, halophilic bacteria.

Introduction

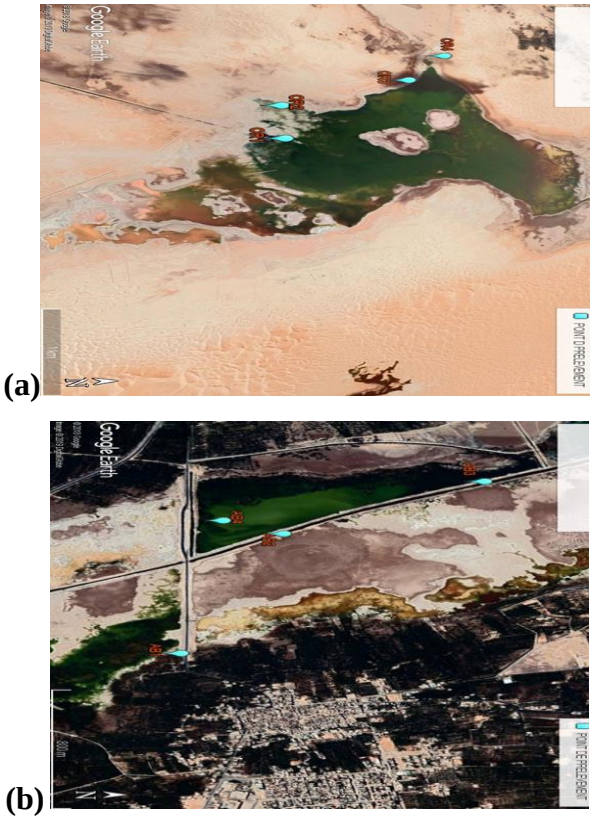
Les milieux hypersalés ou sursalés sont ceux dont la teneur en sels dissouts est supérieure à celle de l'eau de mer (35g/l) **[1].** Lorsqu'on dépasse les 100g/l en sels, les milieux deviennent extrêmes et inhibent la croissance d'une grande majorité des microorganismes **[2].** Pourtant, dans ces environnements où la concentration en sel est proche de la saturation, nichent des communautés de microorganismes halophiles qui requièrent du sel pour leur croissance **[3]**.

Les milieux hypersalins, représentés par les *chotts*, *Sebkhas* et sols salins, sont un exemple typique d'environnements extrêmes. Nombreux en Algérie, ces milieux ont fait l'objet de multiples études mettant en avant leur diversité faunistique et floristique. Néanmoins, l'étude de ces milieux du point de vue diversité microbienne a été peu explorée.

Dans ce travail une approche physico-chimique combinée aux méthodes culturales et moléculaires a été appliquée à la recherche d'halobactéries, dans les échantillons de saumures prélevés des deux sebkhas: *Oum Eraneb* et *Ain El Beida*, situées à Ouargla, dans le Sahara Algérien.

Matériel et méthodes

Durant les compagnes de prélèvement organisées l'année 2013, les échantillons de saumures sont collectés dans des flacons en verre stériles de 250ml et des bouteilles de 500ml, recueillis sur 4 points espacés le long de chaque *sebkha* (Fig.1).



(a)

(b)

Figure 1 : *Sebkha Oum Eraneb* (a) et *chott Ain El Beida* (b) positionnement des points d'échantillonnage (Google Earth-2013)

Les analyses physico-chimiques ont englobé ; température et pH mesurés *in-situ* à l'aide d'un thermomètre intégré au pH mètre de terrain de type WTW, pH 3L5i. La conductivité électrique (CE) évaluée à l'aide d'un conductimètre " Delta OHM- (HD 3406.2) ".

La salinité totale, calculée à partir de la conductivité électrique C_E, via la formule de conversion suivante : $TDS_{eau} = 0{,}8163CE_{eau}$ **[4]**.

Les principaux anions et cations ont été déterminés à partir des échantillons de saumures selon les techniques décrites par Roddier (1996). Le magnésium (Mg^{2+}) par complexometrie utilisant l'éthylène diamine tétra-acéticacid (EDTA). Les carbonates (CO_3^{--}) et les bicarbonates (HCO_3^-) par colorimétrie à 497nm. Les nitrates (NO_3^-), les sulfates (SO_4^-) et les chlorures (Cl^-), le calcium (Ca^{2+}), le sodium (Na^+) et le potassium (K^+) ont été déterminés par spectrophotomètre à flamme DR 2000 (HACH). Une classification des eaux est faite suivant le diagramme géochimique de Piper qui dresse leur faciès chimique.

La recherche des bactéries halophiles cultivables est précédée par un enrichissement **[5]**, où 10ml d'échantillons de saumure sont ajoutés à 90ml du milieu Shegal Gibbon (1960). Après 7 jours d'incubation sous agitation (150 tours/min), l'isolement des souches bactériennes halophiles est effectué sur le même milieu additionné de 20g d'agar, ajusté à pH 7 et inoculé par 0,1ml de la solution mère et des dilutions (10^{-2}-10^{-4}) , portés 15 jours à l'étuve. L'incubation des milieux liquides et solides s'est faite à 37°C, température utilisée pour l'isolement des bactéries à partir d'environnements hypersalins **[6]-[7]**.

Comme suggérée par la référence **[8]**, la caractérisation des souches halobactéries aérobies a suivi une approche phénotypique et physiologique dans le but de classer nos isolats selon leur comportement vis-à-vis des paramètres sel, température et pH. La caractérisation phylogénétique a été réalisée au Laboratoire d'Optique et Biosciences (LOB), Paris-France. La séquence du gène codant l'ARN ribosomal 16S de chaque souche fut comparée par l'intermédiaire de Microbial Nucleotide BLAST sur le site : (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch&BLAST_SPEC = Microbial Genomes).

Résultats et discussions

La physico chimie des saumures des deux sites a permis de les comparer à d'autres environnements salins terrestres (athalassohalins) et aquatiques (thalassohalins) du monde (Tableau I). Il en ressort une abondance en sel et une certaine alcalinité traduite par les pH des saumures avec une dominance des ions Na^{2+} et Cl^-, ce qui rejoint les conclusions de **Litchfield [9]** quant aux lacs hypersalins. Comparés à celles de l'Océan Atlantique, les concentrations de sodium et de chlorure sont 6 fois plus élevées à *Ain El Beida* et 3 fois plus élevées à *Oum Eraneb*. Ces résultats concordent avec ceux rapportés par **[10]** et **[11],** sur les milieux hypersalins où le chlore et le sodium sont les plus représentés à des pourcentages respectifs de 55,04% et 30,61%. Le faciès chimique n'a pas montré de variations notables, il est chloruré sodique chargé en ions

sulfate à *Oum Eraneb* et chloruré sodique potassique au *chott d'Ain El Beida*.

Tableau I : Propriétés physico-chimiques de sebkha *Oum Eraneb* et *chott Ain El Beida* comparés à d'autres écosystèmes salés terrestres et marins [a]

Ecosystèmes	Propriétés physico-chimiques							
	pH	Na^{2+}	K^{+}	Mg^{2+}	Ca^{2+}	Cl^{-}	So_4^{2-}	Salinité
Le Grand Lac Salé UTAH (USA)	7,7	105	6,7	11,1	0,3	181	27	333
Lac Assal (Djibouti)	n.d	77,8	5,4	8	14,6	164	2,3	277
Mer Morte	7,8	40,1	7,6	44	78,2	225	0,44	340
Wadi Natrun (Egypte)	11	142	2,3	ND	ND	155	22,6	394
Lac salé Sambhar SSL (Inde)	9	37,5	0,50	0,00	0,00	21,46	6,00	/
Solar saltern Sfax (Tunisie)	7,5	87,5	8,5	0,29	0,043	261,09	43,2	376,6
Lac Salé El Golea (Algérie)	9	107	nd	0,3	0,4	198	nd	296
SidiAmeur (Algérie) Eau	7,4	67,1	0,17	3	0,51	111	2,1	200
Himalatt (Algérie) eau	7,2	24,5	0,12	1,6	0,22	63,8	3,1	117
Oum Eraneb (Algérie) eau	**8,5**	**37,33**	**1,71**	**4,04**	**5,63**	**64,68**	**41,22**	**128**
Ain El Beida (Algérie) eau	**8,7**	**71,77**	**1,91**	**10,02**	**7,35**	**112,31**	**51,03**	**165**
Mer Aral	8,2	2,2	0,08	0,55	0,51	3,47	3,2	10,2
Mer Caspienne	8,3	3,18	0,09	0,73	0,34	5,33	3,0	12,8
Ocean Atlantic	8,5	10,6	0,38	1,29	0,42	19,2	2,68	34,85

[a] Salinité et ions sont représentés en g l^{-1}, n.d. non déterminé. N.D., Non-détecté. Les références pour les caractéristiques abiotiques d'autres habitats hypersalines et marins sont les suivantes **[12]-[13]-[14] in[11], [15]-[16].**

La flore bactérienne halophile isolée de ces écosystèmes aquatiques sahariens, a révélé un premier isolat dont la croissance optimale s'observe à 45°C et pH 8,5-9**.** Son spectre salin s'étend de 10% à au-delà de 25% (p/v) de NaCl, l'optimum étant à 20% (p/v) de NaCl, profil typique des espèces d'archaea extrêmes halophiles **[17]**. Le second isolat pousse à des températures de 10°C à 45°C, de pH 6 à 9,5 et une concentration de sel entre < 5- 25% (p /v) de NaCl, ce qui lui vaut le titre d'halotolérante extrême **[18]**. La caractérisation phylogénétique confirme la similitude du premier isolat à l'archée extrême halophile *Natronorubrum bangense A33*^{T} et du second isolat à la bactérie halotolérante extrême *Alkalibacillus haloalkaliphilus C-5***.** Identifiées en Chine et en Inde, ces espèces n'ont pas été rapportées auparavant dans de tels écosystèmes du désert Algérien.

Les couleurs légèrement rosés des saumures peuvent être corrélés aux nombres de bactéries extrêmes halophiles orange isolées à *Oum Eraneb* er *Ain El Beida* respectivement (**5.1x10^{3} et 9x10^{3} UFC ml^{-1})**, il avoisine **4.09x10^{3}** et **5.4x10^{3} (UFC ml^{-1})** pour *l'A.haloalkaliphilus* C-5.

Deux types d'environnements peuvent avoir le sel comme facteur agissant sur les populations microbiennes; le sol et l'eau, en particulier dans les régions semi-arides et arides **[19].** Véritables machines évaporatrices**,** l'effet température,

évaporation concentration de sels aux niveaux des deux *sebkhas*, laisse effectivement une empreinte apparente sur l'évolution des flores isolées (Fig2.), avec une dominance marquée de la flore extrême halophile.

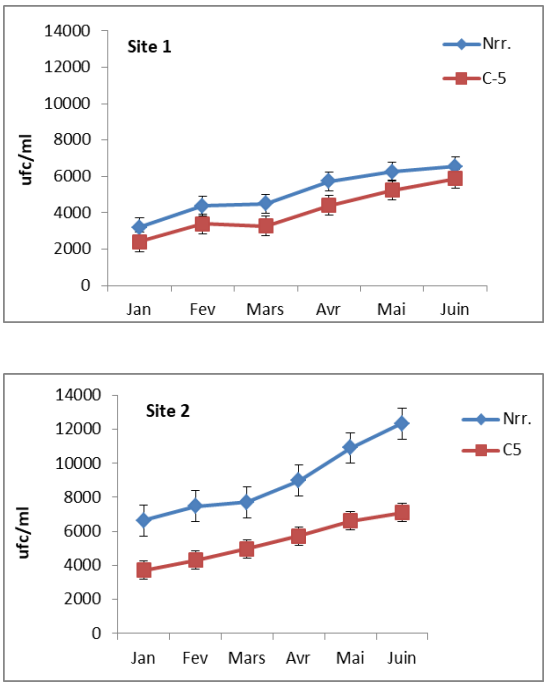


Figure 2: Répartition mensuelle de la flore halophile isolée des saumures des deux *sebkhas*

La répartition spatiale de cette flore par site (Fig.3), montre qu'en quête de sel l'espèce extrême halophile se concentre vers les points de prélèvement les plus retirés des *sebkhas*, les plus abondants en sel (Fig.3). Certes, stimulée par les pH alcalins, la flore haloalcaliphile est freinée par les taux croissant de salinité au fur et à mesure qu'on s'infiltre au cœur de ces dépressions salées.

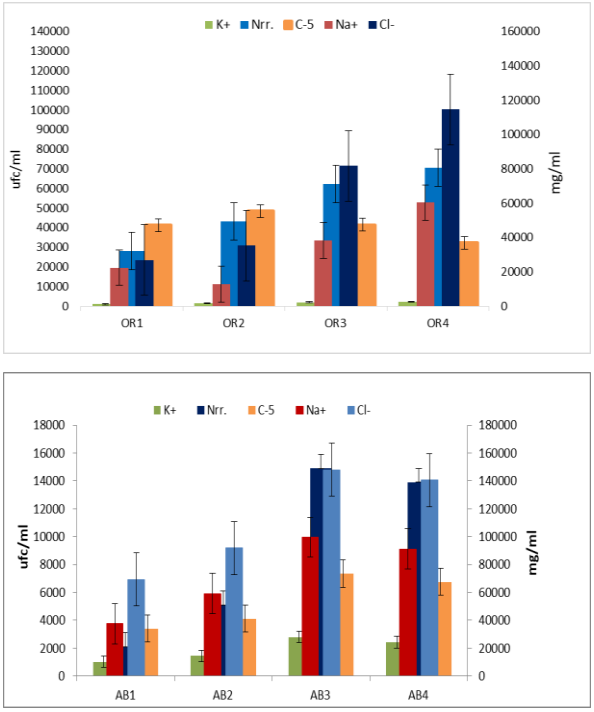


Figure 1 : Variation de la flore halophile isolée des saumures de *sebkha Oum Eraneb* et *Ain El Beida* en fonction de la composition en sel

Conclusion

Peu d'information existe à ce jour concernant la diversité des micro-organismes halophiles et halotolérants isolés des écosystèmes salins. Ce domaine commence à peine à être exploré et apprécié, car parallèlement à leur diversité, les constituants cellulaires et les biomolécules de ces halobactéries sont dotées de propriétés structurales, de stabilité et fonctionnelles tout à fait exceptionnelles.

Références

[1]. Satyanarayana T., Raghukumar C., and Shivaji S. (2005). Extremophilic microbes: Diversity and perspectives: Current science, 89, 78-90.

[2]. Rodriguez-Valera F., (1988). Characteristics and microbial ecology of hypersaline environments. In Halophilic Bacteria. vol. 1, pp 3-30. Edited by F. Rodriguez-Valera. Boca Raton, FL: CRC Press.

[3]. Ebel C., Faou P., Kenel B. & Zaccai G. (1999). Relative role of anions and cations in the stabilization of Halophilic Malate Dehydrogenase. Biochemistry., 38, 9039-9047.

[4]. Forkutsa R., Sommer J. P. A., Lamers K., Kienzler B., Tischbein C., Martius P. L., Vlek G. (**2009).** Modeling irrigated cotton with shallow groundwater in the Aral Sea Basin of Uzbekistan: II. Soil salinity dynamics. Irrig Sci., 27,319–330.

[5]. Hedi A., Sadfi N., Fardeau M.L., Rebib H., Cayol J.L., Ollivier B, and Boudabous A. (2009). Studies on the Biodiversity of halophilic microorganisms isolated from El-Djerid Salt Lake (Tunisia) under aerobic conditions. Int..J..of Microbiology., ID 731786, 17 p.

[6]. Maturrano L., Santos F., Rossello´-Mora R., and Anton J. (**2006)**. Microbial diversity in Maras salterns, a hypersaline environment in the Peruvian Andes. Appl. Environ. Microbiol., 72(6), 3887– 3895.

[7]. Wen H.Y., **Yang L., Shen L.L., Hu B., ZY L. and Jin Q.J. (2009).** Isolation and characterization of culturable halophilic microorganisms of salt ponds in Lianyoungang, China. World J Microbiol Biotechnol., 25, 1727-1732.

[8]. Oren A. (**1997)**. Proposed minimal standards for description of new taxa in the order Halobacteriales. Int. J. Syst. Bacterio., 47:233-236.

[9]. Litchfield C. (1998). Survival strategies for microorganisms in hypersaline environments and their relevance to life on Mars. Meteorit planet. Sci., 33: 813-819.

[10]. Amarouche-Yala S., Hacéne H. (2006). Etude de la microflore du chott Melghir (W. d'El oued) : isolement, identification et évaluation du degré de pollution. Mémoire de magistere en Sciences de la nature. Option Microbiologie de l'environnement.USTHB

[11]. Boutaiba S., Hacène H., Bidle K.A. and Maupin-Furlow J.A. (2011). Microbial diversity of the hypersaline Sidi Ameur and Himalatt Salt Lakes of the Algerian Sahara. Arid Environments.,75 (10), 909-916.

[12]. Post F.J. The microbial ecology of the Great Salt Lake. In: The ecology of the extremely halophilic archaea. Oren, A. (**1994)**.FEMS Microbiology Reviews., 13, 415 -440.

[13]. Oren A. (2002). Diversity of halophilic microorganisms: Environments, phylogeny, physiology, and applications. Journal of Industria Microbiology and Biotechnology., 28, 56–63.

[14]. Hacène H., Rafa F., Chehouni N., Boutaiba S., Bhatnagar T., Baratti J.C., and Olivier B. (2004). Biodiversity of prokaryotic microflora in El Golea Salt Lake, Algerian Sahara. Journal of Arid Environments., 58: 273-284.

[15]. Upasani V, Desai S. Chemical. (**1990)**. Composition of the brines and studies on haloalkaliphilic archabacteria. Arch Microbiol., 154, 589-593.

[16]. Trigui H., **Masmoudi S., Brochier-Armanet C.,MaalejS. and Dukan S. (2011).** Characterization of *Halorubrum sfaxense* sp. nov., a new halophilic archaeon isolated from the Solar Saltern of Sfax in Tunisia. Hindawi Publishing Corporation. I. Journal of Microbiology. doi:10.1155/2011/240191.

[17]. Oren A. (2012). Living with salt: metabolic and phylogenetic diversity of archaea inhabiting saline ecosystems. Andrei, A.S., Banciu HL and Oren, A. FEMS Microbiol Lett., 330,1-9.

[18]. Tiqulan S.M., **Davis D., Hadid H., Kasparian I., Shim S.S. and Murray K.S. (2006).** Halophilic and halotolerant bacteria from river waters and shallow groundwater along the rouge river of Southern Michigan, Enviroment Technolology., 28, 297-307.

[19]. Hachicha M. (2007). Les sols salés et leur mise en valeur en Tunisie. Sécheresse, 18 (1), 45-50.