

**RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE**



Université Constantine I
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Microbiologie
Année universitaire 2013 - 2014

Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Microbiologie Générale

Option : Microbiologie Générale et biologie moléculaire des microorganismes

Présenté par :

Harouna Maidoukia Abdoul Razack

Alkama Mounira

Thème :

**Etude de quelques activités enzymatiques des actinomycètes
isolé de deux écosystèmes extrêmes dans le sud Algérien**

Soutenu l.e : 25 /06/2014

Devant le jury :

Président : Mr HAMIDECHI M.A .Pr Université Constantine I.

Rapporteur : Mr BOUDEMAGH A M.C.A. Université Constantine I.

Examinatrice : ZERMANE F MA. A. Université Constantine I.

Année universitaire 2013 /2014

Remerciements

Ce travail a été réalisé au Laboratoire de biotechnologie de la faculté de science de la nature et de la vie université Constantine 1, sous la direction scientifique de Monsieur Boudemagh. A maitre de conférence université constantine1 nous sommes heureux de pouvoir lui exprimer toute notre profonde gratitude pour son accueil bienveillant et chaleureux, pour sa confiance qu'' il nous accordé et pour la formation Scientifique qu'on a pu acquérir. Nous tenons ici à lui adresser tout nos remerciements Pour ses bons conseils, pour l'intérêt qu'' il a porté à notre travail et tout le temps qu'' il nous a consacré.

Nous ne saurons oublier Melle **Medjemadj Maissa** doctorante de Mr Boudemagh. A laboratoire de biotechnologie, pour sa gentillesse, ses encouragements, les sacrifice et sa Sympathie ainsi que l'aide qu'elle nous a apporté pendant notre stage pratique au laboratoire et d'être resté jusqu'au dernier jour. Nous souhaitons exprimer également nos remerciements à Mr Hamidechi M.A Professeur a l'université Constantine 1 qui nous a fait le grand honneur de présider le jury.

Nous remercions également Madame Zermane.F maitre assistante université Constantine 1 qui nous a fait l'honneur d'accepter d'examiner ce travail. Enfin, nous tenons à remercier les gens du laboratoire présent et de passage qui Nous ont accompagné pour l'ambiance amicale qu'ils ont su créer durant ces dernier mois et pour leur aide et leurs encouragements:

Liste des tableaux

| | |
|--|----|
| Tableau N°1 : CG% des différents genres d'actinomycètes (<i>Larpen et Sanglier, 1989</i>)..... | 4 |
| Tableau N°2 : Répartitions des actinomycètes dans la nature (<i>Googfellow, 1983</i>)..... | 7 |
| Tableau N°4 : Fréquence des divers genres d'actinomycètes dans le sol..... | 8 |
| Tableau N°4 : Quelques enzymes produits par certains genres et espèces d'actinomycètes..... | 13 |
| Tableau N°5 : Paramètre physicochimiques des deux échantillons du sol d'El Oued et Sel du Chott Melghir..... | 29 |
| Tableau N°6 : Nombre d'actinomycètes par échantillons de Sol et de Sel et par milieu de culture additionnés de Nacl pour les échantillons du Sel Chott Melghir..... | 30 |
| Tableau N°7 : Aspect macroscopique et caractères culturaux de différentes colonies sélectionnées à partir des échantillons de la sebkha et de sol..... | 33 |
| Tableau N°8 : activités enzymatiques des 20 Sélectionnées..... | 34 |

Liste des figures

- Figure 1** : Observation microscopique des actinomycètes après coloration de Gram.....5
- Figure 2** : L'aspect filamenteux des actinomycètes.....5
- Figure 3** : Coupe transversale d'une colonie d'actinomycètes avec des hyphes vivants (bleu-vert) et mort (blanc). Le mycélium végétatif et le mycélium aérien avec des chaines de conidiospores sont représentés (*Prescott et al., 2003*).....5
- Figure 4** : La couleur des Actinomycètes sur milieu solide.....6
- Figure 5** : La morphologie des colonies des actinomycètes sur Milieu solide.....6

Liste des photographies

| | |
|---|----|
| <u>Photographie1</u> : Deux Sebkhass du Chott Melghir..... | 20 |
| Photographie N°2 : Aspect macroscopique de quelques colonies isolés des 2 échantillons..... | 33 |
| <u>Photographie N°3</u> : Résultat de l'activité lypolytique des souches d'actinomycètes sur milieu gélosé au jaune d'œuf..... | 35 |
| <u>Photographie N°4</u> : Résultat de l'activité de l'estérase sur les souches d'actinomycètes testés sur le milieu sierra au tween 80..... | 35 |
| <u>Photographie N°5</u> : Résultat de l'hydrolyse de la pectine sur les souches d'actinomycètes sur le milieu pectine-agar..... | 36 |
| <u>Photographie N° 6</u> : Résultat de l'activité cellulolytique des souches d'actinomycètes sur milieu liquide ISP9 contenant une bandelette de papier Whatman N°1..... | 37 |
| <u>Photographie N° 7</u> : Mise en évidence de la nitrate réductase sur le milieu mannitol-mobilité-nitrate..... | 37 |
| <u>Photographie N°8</u> : Résultats des tests sur les souches à pouvoir proteolytiques , (à gauche dégradation de la gélatine et à droite la dégradation de la caseine)..... | 38 |
| <u>Photographie N° 9</u> : Test de l'hydrolyse de l'amidon par des souches d'actinomycètes. | |
| <u>Photographie N°10</u> : Résultat positif de la catalase d'une souche actinomycétale..... | 40 |

Table des matières

| | |
|-------------------|---|
| Introduction..... | 1 |
|-------------------|---|

Partie bibliographique

| | |
|--|----|
| 1.les actinomycètes..... | 4 |
| 1.1 Généralité..... | 4 |
| 1.2 Propriétés générales des actinomycètes..... | 5 |
| 1.3 Les caractères cultureux..... | 6 |
| 1.4 Ecologie et distribution des actinomycètes dans la nature..... | 7 |
| 1.4.1 Le sol..... | 7 |
| 1.4.2 L'air..... | 8 |
| 1.4.3 Les composts..... | 9 |
| 1.4.4 Eaux douces et milieux marins..... | 9 |
| 1.5 Rôle écologiques des actinomycètes..... | 9 |
| 1.6 Physiologie et métabolisme..... | 10 |
| 1.6.1 Physiologie..... | 10 |
| 1.6.1.1 Le taux d'humidité..... | 10 |
| 1.6.1.2 La température..... | 10 |
| 1.6.1.3 Le Ph..... | 11 |
| 1.6.1.4 Rapports avec l'oxygène..... | 11 |
| 1.6.1.5 Matière organique..... | 11 |
| 1.6.2 Diversité métabolique..... | 11 |
| 2. Biodiversité des actinomycètes extrémophiles..... | 12 |
| 2.1 Thermophiles..... | 12 |
| 2.2 Halophiles..... | 15 |
| 3. Taxonomie des actinomycètes..... | 15 |
| 4-Classification..... | 17 |

| | |
|----------------------------|----|
| 4.1 Mycobacteriacée..... | 17 |
| 4.2 Actinomycétacées..... | 17 |
| 4.3 Streptomycétacées..... | 17 |
| 4.4 Actinoplanacées..... | 18 |

Matériel et Methodes

| | |
|--|----|
| 1. Ecosystèmes étudié..... | 19 |
| 1.1 Le Chott Melghir..... | 19 |
| 1.2 El Oued..... | 20 |
| 2-Prélèvement des échantillons..... | 21 |
| 2.1 Le sel du Chott Melghir..... | 21 |
| 2.2 Le sel du Chott Melghir..... | 21 |
| 3-Caractéristiques physicochimique des échantillons..... | 21 |
| 3-1 Détermination du taux de la matière organique..... | 22 |
| 3-2 Détermination du carbone organique | 22 |
| 3-3 Mesure du pH..... | 22 |
| 3-4 Mesure du pH et de la conductivité électrique..... | 22 |
| 3.5. Détermination de la teneur calcaire actif..... | 23 |
| 3.6. Mesure de la salinité..... | 23 |
| 3.7. Dosage de l'azote organique..... | 23 |
| 4- Isolement des actinomycètes..... | 23 |
| 4-1 Milieux d'isolement..... | 23 |
| 4-2 Préparations des dilutions décimales..... | 24 |
| 4-3 Ensemencement et incubation..... | 24 |
| 4.4. Dénombrement..... | 24 |
| 4.5. Purification des souches..... | 24 |
| 4-6 Conservation des souches..... | 25 |
| 5-Etudes des caractères morphologiques..... | 25 |

| | |
|---|----|
| 5.1 Observation macroscopique des colonies..... | 25 |
| 5.2. Coloration de Gram..... | 25 |
| 6. Mise en évidence des activités enzymatiques..... | 25 |
| 6-1 La recherche de l'amylase..... | 25 |
| 6-2 La recherche des protéinases..... | 26 |
| 6-2-1 La Caseinase..... | 26 |
| 6-2-2 La gélatinase..... | 26 |
| 6-3 La recherche de la catalase | 26 |
| 6-4 La recherche de la cellulase..... | 26 |
| 6-5 La recherche des lipases..... | 27 |
| 6-5-1 L'estérase..... | 27 |
| 6-5-2 La lécithinase et lipoprotéinase..... | 27 |
| 6-6 La recherche de nitrate réductase..... | 27 |
| 6-7 La recherche de la pectinase..... | 27 |

Résultats et discussion

| | |
|--|----|
| 1. Caractéristique physico-chimiques des échantillons..... | 29 |
| 2. Isolement des actinomycètes..... | 30 |
| 3. Etude de l'aspect macroscopique et caractères culturels des actinomycètes isolés..... | 32 |
| 4. Etude de l'aspect microscopique après coloration de Gram..... | 34 |
| 5. Mise en évidence de certaines activités enzymatiques des isolats d'actinomycètes..... | 34 |
| 5.1 Activité Catabolisme des lipides..... | 35 |
| 5.2 Activité pectinolytique..... | 36 |
| 5.3 Activité cellulolytique..... | 36 |
| 5.4 Teste de nitrate réductase..... | 37 |

| | |
|----------------------------------|----|
| 5.5 Activité protéolytique..... | 38 |
| 5.6 Activité amylolytique..... | 39 |
| 5.7 Activité de la catalase..... | 39 |

Conclusion

Référence bibliographiques

Annexe

Introduction

Les actinomycètes sont des bactéries filamenteuses à coloration de Gram positive qui subissent des différenciations morphologique durant leur cycle de vie. En réponse à des conditions défavorables, tel qu'un déficit en nutriments et en eau, ici les actinomycètes sporulent. Ce n'est que lorsque les conditions redeviennent favorables que les spores peuvent germer et former de nouveau le mycélium végétatif. Cette propriété joue un rôle important dans leur large distribution et dissémination dans la nature.

L'étude des actinomycètes a pris son ampleur surtout après la découverte de l'aptitude de certains membres de ce groupe à produire des antibiotiques dont plus de 50 ont été isolés uniquement à partir des espèces du genre *Streptomyces*, à savoir la streptomycine, la néomycine, le chloramphénicol, et les tétracyclines. Généralement, les actinomycètes, habitent le sol et son d'importants décomposeurs de la matière organique, ce qui rend le sol fertile et par conséquent l'amélioration des récoltes. En plus du sol, ils ont été isolés dans de nombreux environnement aquatiques ; à savoir les écosystèmes marins, l'eau douce et les marécages salés (**Al-Zarban *et al.*, 2002 ; Boughachiche *et al.*, 2005 ; Kitouni *et al.*, 2005**)

Ils sont capables de métaboliser plusieurs et différent composés comme les sucres (Polysaccharides), les alcools, les acides aminés et les composés aromatiques par production d'enzymes extracellulaires. Leur aptitude à dégrader les pesticides, les herbicides, les pesticides et les hydrocarbures avait également été signalée (**Benimeli *et al.*, 2003**). Cette diversité métabolique est due à leur génome extrêmement large qui a une centaine de facteur de transcription qui contrôle l'expression des gènes qui leurs permettent de répondre a leurs besoins. Actuellement, des recherches visent l'utilisation de ces bactéries dans l'agriculture en tant qu'agents de bio-contrôle dans l'espoir de diminuer l'utilisation néfaste des pesticides. Certaines caractéristiques des actinomycètes les rendent agent de bio-contrôle importants, principalement contre les mycètes phytopathologies dans le sol. Ces caractéristiques comprennent la production de différents types de métabolites secondaires et de substance biologiquement active, qui sont d'une valeur commerciale élevée : à savoir les enzymes qui visent directement la paroi des mycètes et les antibiotiques. Les actinomycètes sont aussi connues par leur production d'autres métabolites secondaires tel que les antibactériens. Les antiparasitaires les anti tumoraux, et les immunosuppresseurs (**Angehrn *et al.*, 2004 ; Imada 2005**)

L'isolement de souches d'actinomycètes actives à partir d'écosystèmes extrêmes permet, éventuellement, la découverte de souches rares ou de souches pouvant avoir un potentiel de production élevé ou inexploité, Le sud Algérien est un écosystème aride caractérisé par des ressources naturelles limitées, un sol pauvre, des formations végétales basses et ouvertes et des conditions climatiques sévères.

Le sol, à partir duquel les actinomycètes peuvent colonisés de nombreux biotopes, en est le réservoir le plus riche (**Larpent et Sanglier, 1989 ; Xu 1996 ; Katsifas *et al.*, 1999**). Elles représentent une partie significative de la population microbienne du sol. D'après **Goodfellow et Williams 1983** elles sont présentes en nombre avoisinant le million par gramme.

L'accumulation dans le sol de quantités excessives de sels solubles caractérise les régions arides et subarides, bien qu'elles se produisent parfois en dehors de ces zones. Dans ce type de sol la végétation diminue de manière considérable. Ce qui aura comme conséquence la diminution de matière organique dans le sol et donc une compétition féroce entre les microorganismes du sol, et du coup une réduction importante du taux des microorganismes organotrophes aussi bien en quantité qu'en qualité. Et vu que les actinomycètes sont des producteurs importants d'antibiotiques, Ils vont utiliser cette production à leur profit pour qu'ils puissent persister dans le sol. Mais ce n'est nullement pas la seule difficulté à laquelle les actinomycètes doivent surmonter ; l'adaptation à la très haute salinité du milieu est une condition importante pour que ces bactéries puissent y croître. Pour cela, tous les microorganismes doivent maintenir leur cytoplasmes au moins, en iso-osmose avec leur environnements. De plus, les actinomycètes sont connues par leur temps de génération très élevé comparé à celui des bactéries principalement, ce qui rend leur isolement une tâche difficilement réalisable.

L'objectif principal de ce travail est d'étudier la biodiversité métabolique des actinomycètes issue de la sebkha de chott Melghir et du sol d'El Oued, ces zones arides constituent des écosystèmes extrêmes pour la vie microbienne. Pour atteindre cet objectif, notre travail devait passer par deux phases.

La première phase consiste en l'isolement des actinomycètes provenant de nos deux échantillons (sol et sel) pour ceci, il était primordial de sélectionner des milieux de cultures sélectifs pour l'isolement des actinomycètes, ainsi que des techniques favorisant la croissance de ce groupe de bactéries par rapport aux autres microorganismes du sol qui ont des taux de croissance très élevés comparé avec celui des actinomycètes.

La seconde partie consiste à effectué des testes enzymatiques en vu de mettre en évidence la biodiversité métabolique de nos isolats, pour cette partie le choix des milieux de culture est aussi très important pour la bonne réussite des diff rent testes.

1. Les actinomycètes

1.1 Généralités

Les bactériologistes considèrent les actinomycètes comme des bactéries tandis que les mycologistes les considéraient comme des champignons (**Gottlieb, 1997**). Aujourd'hui ce problème est résolu et ce groupe des microorganismes est définitivement classé parmi les bactéries (**Lechevalier, 1981**). Les actinomycètes sont des bactéries à coloration de Gram positives (**Williams et al., 1993**) aérobies avec un G+C % est supérieur à 55% généralement compris entre 60 et 75% (**Ensing, 1978 ; Larpent et Sanglier, 1989 ; Chun et al., 1997**) (Tableau N°1).

Tableau N°1 : CG% des différents genres d'actinomycètes (Larpent et Sanglier, 1989).

| Genre | G+C% |
|-----------------------|-------------|
| <i>Mycobactéries</i> | 64-70 |
| <i>Actinomycètes</i> | 63-73 |
| <i>Nocardia</i> | 67-69.4 |
| <i>Streptomyces</i> | 69-76 |
| <i>Micromonospora</i> | 71.4-72 |
| <i>Actinoplanes</i> | 70.6-76 |

Ils se caractérisent par la formation d'hyphes filamenteux qui ne subissent normalement pas de fragmentation et qui produisent des spores asexués par leur morphologie générale. Ils ressemblent fortement aux mycètes. Cette ressemblance résulte en partie d'une adaptation aux mêmes habitats (**Figure 1 et 2**).

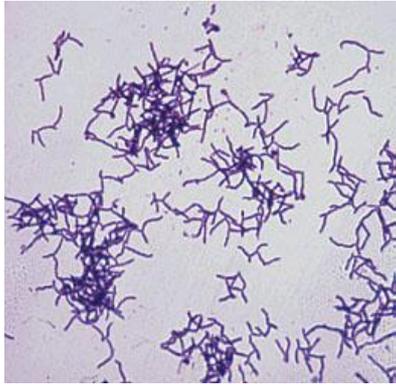


Figure 1 : Observation microscopique des actinomycètes après coloration de Gram.



Figure 2: L'aspect filamenteux des actinomycètes.

1.2 Propriétés générales des actinomycètes

Les actinomycètes partagent de nombreuses propriétés :

- Ils développent un réseau ramifié d'hyphes. Ceux-ci poussent à la surface et à l'intérieur du substrat pour former un tapis dense d'hyphes, qu'on appelle mycélium végétatif. Les hyphes qui poussent vers le haut forment un mycélium aérien (**figure 3**)

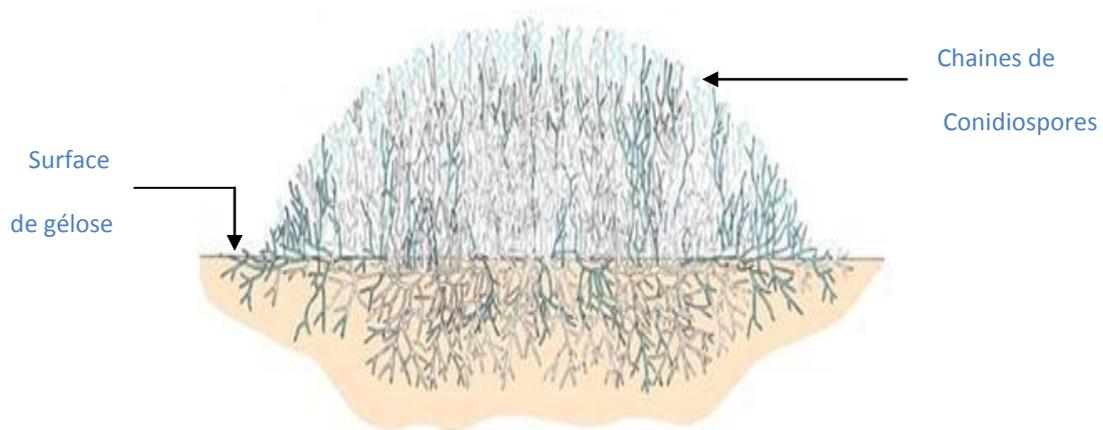


Figure 3 : Coupe transversale d'une colonie d'actinomycètes avec des hyphes vivants (bleu-vert) et mort (blanc). Le mycélium végétatif et le mycélium aérien avec des chaînes de conidiospores sont représentés (**Prescott et al., 2003**).

- La plupart ne sont pas mobiles, lorsqu'il y a mobilité elle est limitée aux spores flagellées.
- La composition de la paroi des actinomycètes ne renferme ni chitine ni cellulose mais une glycoprotéine contenant de la lysine ou de l'acide diaminopimélique et leur cytologie est comme celle des bactéries (**Lechevalier et Lechevalier, 1985**).
- Les spores d'actinomycètes se développent par septation des extrémités du filament habituellement en réponse à la chaleur mais supportent bien la dessiccation et ont de ce fait une importante valeur adaptative
- Les actinomycètes préfèrent un pH neutre ou alcalin, ils sont généralement mésophiles d'autres sont thermophiles tolèrent des températures avoisinant 50°C et peuvent aller jusqu'à 60°C (**Omura, 1992**)

1.3 Les caractères cultureux

Plusieurs milieux sont utilisés pour l'isolement sélectif des actinomycètes on cite par exemple : le milieu Olson, le milieu Bennett, le milieu amidon-caséine et bien d'autre, mais il existe à ce jour aucune liste exhaustive (**Larpen et Sanglier, 1989**)

Les colonies qu'ils forment sur milieux solides sont caractéristiques, elles résultent de l'accumulation des hyphes ramifiés et non pas de cellules comme c'est le cas chez les bactéries, ces colonies de 1 à 4 mm de diamètre ont un aspect compact, elles sont le plus souvent pigmentée en jaune, orangé, blanc, crème, violet, rose, gris et noir (**figure 4**) (**Leclerc, 1977**). Sec, lisse, rugueux ou en chou-fleur (**figure 5**) à contour lisses ou échancrés plus ou moins profondes.



Figure 4 : La couleur des Actinomycètes sur milieu solide.

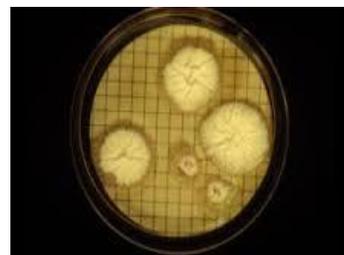


Figure 5 : La morphologie des colonies des actinomycètes

1.4 Ecologie et distribution des actinomycètes dans la nature

Les actinomycètes colonisent une large variété d'habitats comme le montre le **tableau N°2** ils sont capables de se développer sur une large gamme de substrats. Une majorité des actinomycètes sont saprophytes mais il existe des formes parasites et symbiotiques des plantes ou des animaux (**Lechevalier et Lechevalier, 1985, Goodfellow, 1985**)

Tableau N°2 : Répartitions des actinomycètes dans la nature (**Goodfellow, 1983**)

| Genre | Habitats |
|--------------------------|--|
| <i>Actinomodura</i> | Sol |
| <i>Actinoplanes</i> | Sol, eau, litière |
| <i>Frankia</i> | Nodule de racine |
| <i>Microbispora</i> | Sol |
| <i>Micromonospora</i> | Sol, eau |
| <i>Nocardia</i> | Sol, eau |
| <i>Rhodococcus</i> | Sol, eau, fumier, litière |
| <i>Sacharomonospora</i> | Matière en décomposition |
| <i>Streptomyces</i> | Sol, eau, litière |
| <i>Streptosporangium</i> | Sol |
| <i>Thermomonospora</i> | Matière en décomposition et fermentation |

1.4.1 Le sol

Les actinomycètes sont largement répandus dans tous les sols à l'exception des sites exposés à des conditions trop extrêmes. Ils sont surtout présents dans la couche comprise entre la surface du sol et jusqu'à 2m de profondeur c'est-à-dire dans la rhizosphère. Le genre *Streptomyces* est le plus fréquent dans le sol, il couvre à lui seul 95% des souches d'Actinomycètes isolées (**Nonomura, 1969**).

D'après **Goodfellow** et **williams 1983** elles sont présentes en nombre avoisinant le million par gramme. **Waksman** a pu démontrer que le nombre des actinomycètes diminue au fur et à mesure que la profondeur augmente (**Waksman, 1963**). Selon cet auteur, alors que la couche superficielle contient au moins 80% de bactéries d'actinomycétales par rapport au nombre totale de microorganismes la couche située à une profondeur de 80 cm n'en contient plus que 16 à 14% cela est confirmé par **Iwai** et **Takashi 1992**. Le **Tableau 3** montre la fréquence des divers genres d'Actinomycètes dans le sol.

Tableau 3 : Fréquence des divers genres d'actinomycètes dans le sol

| Genre | Pourcentage (%) |
|--------------------------|-----------------|
| <i>Streptomyces</i> | 95,34 |
| <i>Nocardia</i> | 1,98 |
| <i>Micromonospora</i> | 1,40 |
| <i>Thermomonospora</i> | 0,22 |
| <i>Actinoplanes</i> | 0,20 |
| <i>Microbispora</i> | 0,18 |
| <i>Mycobacterium</i> | 0,14 |
| <i>Streptosporagium</i> | 0,10 |
| <i>Actinomadura</i> | 0,10 |
| <i>Microspolyspora</i> | 0,10 |
| <i>Pseudonocardia</i> | 0,06 |
| <i>Microellobosporia</i> | 0,04 |

1.4.3 L'air

La présence d'Actinomycètes dans l'air, sous forme de propagules, est proportionnelle aux poussières dispersées par le vent.

L'aire constitue pour les actinomycètes un moyen de transport non pas un habitat (**Gazenko et al., 1989 ; Reponen et al., 1989**). Les actinomycètes se développent et libèrent leurs spores dans l'air provoquant lorsque elles sont inhalées des maladies respiratoires (**Gazeno et al., 1985 ; Suntari et al., 2002**).

1.4.4 Les composts

Les actinomycètes font partie des microorganismes décomposeurs de la matière organique par exemple les *Thermoactinomyces* et les *Faenia*. Ils agissent plus tardivement que les bactéries et les champignons. Ils sont spécialisés dans les derniers stades de compostage en attaquant des structures résistantes comme la lignine (**Mincer et al., 2002**).

1.4.5 Eaux douces et milieux marins

Les Actinomycètes sont bien représentés dans ces milieux d'où l'on peut facilement isoler des souches de *Microspora*, d'*Actinoplanes* et de *Streptosporangium*. C'est essentiellement dans les sédiments des fonds fluviaux ou lacustres que ceux-ci sont présents où ils jouent un rôle important dans la décomposition des débris végétaux et donnent à l'eau son odeur de terre et sa saveur. L'écologie des actinomycètes des mers a été revue par **Goodfellow** et **Williams en 1983**, il a été démontré que les actinomycètes constituent une petite partie de la flore totale leur nombre est faible comparant à leur présence dans les eaux douces ou les sols.

En **1946**, **Zobell** a mis en évidence à partir d'échantillon marins des souches de *Mycobacterium*, *Actinomyces*, *Nocardia* et *Micromonospora* et il nota l'absence de streptomycètes. Dans la même année par contre **Humm** et **Shepard** isolèrent entre autre des streptomycètes. De même **freitas** et **Blat en 1954** trouvèrent des streptomycètes cellulolytiques sur des filets de pêche détériorés.

1.5 Rôle écologiques des actinomycètes

Nous avons vu précédemment qu'on retrouve les actinomycètes presque partout dans la nature. Toutes les bactéries ne font pas le même travail. La fonction écologique des actinomycètes au sein d'un écosystème, est la décomposition des substances organiques. Les actinomycètes sont fort nombreux dans les sols, ils se

joignent aux autres bactéries et aux champignons. Les *Thermoactinomyces* et *Faenia* se trouvent dans les composts comme nettoyeurs de la nature et formateurs d'humus. De plus, les actinomycètes ont un caractère symbiotique avec certaines espèces végétales permettent la fixation de l'azote gazeux.

Le genre *Frankia* vit en association avec de nombreux arbres arbrisseaux, tels que les aulnes, des éricacées ou des myricacées, sur les racines desquels ils forment des nodules pour accumuler l'azote atmosphérique que les plantes ne sont pas capables d'utiliser dans sa forme gazeuse. Cette symbiose permet aux plantes de s'épanouir tout en produisant un sol riche en azote dans lequel d'autres plantes peuvent pousser. D'autres espèce du même genre forment des nodules sur le tronc des plantes avec les quelles ils vivent en symbiose (Filao /Casuarinacées) (*Haanssuu, 2002*).

1.6 Physiologie et métabolisme

1.6.1 Physiologie

Au niveau du sol, les actinomycètes représentent l'une des principales communautés microbiennes. Leur présence est significativement influencée par les conditions environnantes l'humidité, la température, le pH, la salinité, le type de sol, la profondeur dans le sol, les faibles taux d'humidité, la nature et l'abondance de la matière organique et la végétation du sol (*Sykes et Skinner, 1973 ; Basilio, 2003*).

1.6.1.1 Le taux d'humidité

En général, les actinomycètes ont été isolés dans des sols contenant des taux faibles jusqu'à modérés d'humidité, ce qui suggère qu'ils ne sont pas beaucoup influencés par les conditions semi-arides (*Oskay et al., 2004 ; Prescott et al.,2007*).

1.6.1.2 La température

Les actinomycètes sont des microorganismes mésophiles. Cependant, il existe des espèces thermophiles, principalement dans le genre *Thermoactinomyces* dont la température optimale est 50 et 60°C. Ces organismes avaient été distingués de leurs homologues thermophiles appartenant au genre *Thermomonospora* grâce à leurs spores qui résistent à une température de 90°C pendant 30 minutes et par la résistance à la novobiocine (25 µg/ml). De plus, l'activité cellulolytique est absente pour le genre *Thermoactinomyces* et commune pour *Thermomonospora* (*Holt et al., 1994*).

Le genre streptomyces comporte aussi des espèces thermophiles comme *streptomyces thermocophilus* (Kim *et al.*, 2000). Et même psychrophiles (Holt *et al.*, 1994).

1.6.1.3 Le pH

La plupart des actinomycètes du sol sont neutrophiles et croissent dans un intervalle de pH compris entre 5 et 9 avec une croissance optimale à pH neutre ou légèrement alcalin (Lee et Hwang, 2002). Les procédures d'isolement ont été traditionnellement basées sur ce caractère de neutralité.

Des travaux ont montré l'existence d'une large diversité d'actinomycètes acidophiles qui diffèrent morphologiquement des espèces neutrophiles (Basilio, 2003). Les souches acidophiles croissent à des valeurs de pH comprises entre 3.5 et 6.5 avec un pH optimal de croissance compris entre 4.5 et 5.5 tel que : *Streptacidiphillus jiangxiensis* (Huang *et al.*, 2004) et *Streptacidiphilus orzae* (Wang *et al.*, 2006).

1.6.1.4 Rapports avec l'oxygène

Les actinomycètes isolés du sol sont généralement aérobies mais certains genres peuvent être anaérobies facultatifs voir même anaérobies stricts comme est le cas du genre *Actinomyces*.

1.6.1.5 Matière organique

En 1986, Henis a montré que le nombre des actinomycètes est corrélé positivement avec le taux de matière organique et que de larges populations d'actinomycètes coïncidaient avec des taux relativement élevés organique, quelque soit le taux de la salinité du sol (Lee et Hwang, 2002).

1.6.2 Diversité métabolique

La majorité des nutriments présents dans l'environnement des microorganismes sont sous forme de polymères. L'hydrolyse de ces polymères est une étape importante à l'approvisionnement du métabolisme microbien.

C'est grâce à leur diversité métabolique, c'est à dire à leur capacité à utiliser une large gamme de source de carbone et d'énergie, et à croître dans des conditions très variées, que les actinomycètes peuvent vivre dans des habitats très différents. D'ailleurs, grâce à cette diversité métabolique, les actinomycètes jouent un rôle

extrêmement important dans la minéralisation de la matière organique par production d'enzymes extracellulaires, ce qui améliore les récoltes par la fertilisation du sol.

Ainsi, il a été prouvé que les actinomycètes dégradent de manière intensive la chitine (**De Boer et al., 1998**) qui rentre dans la constitution de la paroi des moisissures et la carapace des arthropodes.

En outre, certains dégradent activement les pesticides tel que certaines souches du genre *streptomyces* qui sont capables de croître sur milieux contenant 5-50 µg/l d'aldrine, de chlordane ou de lindane (organochlorines) (**Benimeli et al., 2003**).

D'autres sont capables de dégrader l'amidon comme est le cas de *Thermoactinomyces vulgaris* (**Kuo et Hartman, 1966**). Ou la cellulose par *Streptomyces cellulolyticus* (**Li, 1997**) ; et le xylane par *Streptomyces mexicanus* (**Petrosyan et al., 2003**)

2. Biodiversité métabolique des actinomycètes extrémophiles

2.1 Thermophile

Les actinomycètes thermophiles jouent un rôle important dans la minéralisation des matières organiques (lignines, cellulose,.....), grâce à la production de nombreux enzymes lytiques extraits cellulaires comme par exemple les amylases, les xylanases les lipases. Il existe une réelle demande au niveau industriel pour ces enzymes surtout les enzymes thermostables afin d'améliorer certains procédés de fabrication. Les principaux enzymes produites par les actinomycètes thermophiles sont rassemblé dans le **Tableau N°4**

Tableau N°4 : Quelques enzymes produits par certains genres et espèces d'actinomycètes

| Les genres et espèces des actinomycètes | Les enzymes | Température optimale | Références |
|---|-------------|----------------------|--|
| Thermobifida fusca Thermoactinomycètes vulgaris, Thermomonospora curvata Saccharomonospora viridis | Amylase | 60° | Chao-Hsun Y. and Wen-Hsiung L., 2007 ; Hankin L. <i>et al.</i> , 1971; Beppu T., 1992. |
| Streptomyces transformant | Cellulaire | 50° | Hung-Der J., kuo-Shu C., 1991 ; Tahtamouni <i>et al.</i> , 2006. |
| Microbispora, Micromonospora, Nocardiopsis, Planobispora, Planomonospora, Thermomonospora, Nocardia mediterranei, Actinomadura pelletierii | Chitinase | | Beppu T., 1992 ; Cerniglia C. E., 1992. |
| Actinonomyces israeli | Dextrinase | | Beppu T., 1992 |
| Actinomadura Streptomyces Thermoactinomyces | Esterase | | Min Tseng <i>et al.</i> , 2007 |
| Streptomyces thermoviollaceus, Streptomyces viridosporus, Streptomyces fusca | Liginase | | Garzenko S. V. <i>et al.</i> , 1998 |

| | | | |
|--|----------|---------|--|
| Streptovericillium Micromonospora chalcea Streptomyces fradiae Streptomyces cinnamomeus | Lipase | 50-75°C | McCathy A. J. <i>et al.</i> , 1985 ; Beppu T., 1992 ; Sztajer <i>et al.</i> , 1988 ; Hou, 1994. |
| Actinomadura, Micromonospora, Nocardiopsis , Plasnomonospora, Planobispora Streptomyces rimosus | Protéase | 70°C | Tahtamouni <i>et al.</i> 2006 ; Beppu T., 1992 ; Hospper D.J. and Kemp P. D., 1980 |
| Micromonospora, Streptosporangium, Streptomyces Microbispora, Actinoplanes | Protéase | 70°C | Tsuchiya K. <i>et al.</i> , 1999 ; Beppu T., 1992 ; Bell K. S <i>et al.</i> , 1998. |
| Thermomonospora Microbispora, Micromonospora, Streptomyces Promicromonospore | Xylanase | 60-80°C | Tahtamouni <i>et al.</i> , 2006 ; Beppu T., 1992 ; Hankin L. <i>et al.</i> 1971 ; Haggblom M. M. <i>et al.</i> , 1988. |

2.2 Halophiles

Tresener *et al.*, (1968) et **Gottlieb (1973)** étaient les premiers à avoir étudié la présence des actinomycètes dans les environnements à salinité élevée et la tolérance de ces microorganismes aux concentrations élevées de NaCl.

Parmi les actinomycètes halophiles nous pouvons citer *Nocardiopsis Kunsanensis* (**Chun *et al.*, 2000**) isolée de tables de sel, *Nocardiopsis salina* (**Li *et al.*, 2006**) isolée d'un sol hyper salin ; et *Sacharomonospora halophila* (**Al-Zarban, 2002**) isolée d'un sol de marécage au Koweït.

Les microorganismes halophiles peuvent être regroupés de manière conventionnelle sur la base qu'ils exigent la présence du NaCl dans leur milieu pour leur croissance. Dans les écosystèmes marins, les microorganismes faiblement halophiles peuvent croître à une concentration de 2-3% de NaCl. Les halophiles modérés croissent dans un intervalle plus large et élevé (5-20% poids/volume). Les halophiles extrêmes, y compris les Halobacteria et les Halococci, sont capables de croître sur milieux saturés de NaCl et incapables sur une concentration de NaCl inférieure à 12% (**Yoshida, 1991**).

Les actinomycètes synthétisent une grande panoplie d'enzymes qui sont entre autres la tyrosine hydrolase synthétisée par une espèce appartenant au genre *Streptomyces* et qui permet la synthèse de 3,4-Dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) à partir de la tyrosine, ils peuvent également synthétiser les cellulases par certaines espèces actinomycétales tel que *Streptomyces cellulolyticus* (**Li, 1997**) et *Streptomyces thermocoprophilus* (**Kim *et al.*, 2000**). Les actinomycètes Synthétisent aussi les xylanases.

3. Taxonomie des actinomycètes

La taxonomie des actinomycètes a beaucoup évolué au cours des vingt à trente dernières années en même temps qu'évoluait le nombre de genres d'actinomycètes.

L'ordre des actinomycètes qui comptait 5 genres en **1948**, 9 en **1958**, en comprenait 37 en 1974 selon la 8^{ème} édition du *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (**Gottlieb, 1974**).

En 1989, l'application de critères chimiotaxonomiques a permis de répartir les actinomycètes en sections (de 26 à 33) sur la base de caractères morphologiques et biochimiques.

Selon la classification présentée dans le *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* édité en 1994, les actinomycètes sont répartis en 8 groupes (de 22 à 29) avec l'introduction de nouveaux genres et avec une division plus précise du groupe (22) des *Nocardioformes* en 4 sous-groupes et du groupe (26) des *Maduromycetes* en 2 sous groupes.

En 1997, **Stackebrandt et al.**, proposent une nouvelle classification hiérarchique des actinomycètes qui reposent uniquement sur l'analyse des séquences des ARNr 16S et des gènes codant pour les ARNr 16S. Donc, ils ont décrit une nouvelle classe, qui se définit comme un ensemble de souches présentant plus de 80% de similitude dans la séquence des ARNr 16S ou de l'ADNr 16S et possédant un résidu adénine à la position 906 et un résidu adénine ou cytosine à la position 955 (à l'exception des sous classes *Rubrobacteridae* et *Spherobacteridae* où l'on trouve un résidu uracile à la position 955).

Actuellement et selon la classification du « Taxonomic Outline of The Prokaryotes, *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* », seconde édition 2004 (**Garrity et al., 2004**), le phylum *Actinobacteria* (bactéries à Gram positif et G+C % élevé) est constitué d'une seule classe dénommée également « *Actinobacteria* ». La classe des *Actinobacteria* est divisée en 5 sous-classes: *Acidimicrobidae*, *Rubrobacteridae*, *Coriobacteridae*, *Sphaerobacteridae*, *Actinobacteridae*

Chacune de ces sous classes est constituée d'un ou de plusieurs ordres eux-mêmes constitués d'une ou de plusieurs familles. Dans la sous-classe des *Actinobacteridae*, l'ordres *Actinomycetales* est subdivisé en 10 sous-ordres : *Actinomycineae*, *Micrococcineae*, *Corynebacterineae*, *Micromonosporineae*, *Propionibacterineae*, *Pseudonocardineae*, *Streptomycineae*, *Streptosporangineae*, *Frankineae* et *Glycomycineae*.

4. Classification

En général, on peut subdiviser les Actinomycètes en 4 grandes familles

4.1 Mycobacteriacée

Elles renferment les Actinomycètes dont la morphologie est voisine de celle des bactéries. Les mycobacteriacées diffèrent de toutes les bactéries et autres Actinomycètes par leur acido-résistance grâce à la présence de substance cireuse présente dans leurs cellules. Cette famille est représentée par le seul genre *Mycobacterium* qui renferme plusieurs espèces pathogènes, dont la plus connue est *Mycobacterium tuberculosis*, agent de la tuberculose (**Krasilnikov, 1958**).

4.2 Actinomycétacées (ou Pro-Actinomycètes)

Cette famille est représentée par les genres *Nocardia* et *Actinomyces*. Le genre *Nocardia* comprend de nombreuses espèces très répandues dans le sol. Les colonies, difficiles à distinguer des colonies bactériennes, sont souvent confondues avec ces dernières lors des comptages. Le genre *Actinomyces* ne présente aucun intérêt en microbiologie du sol (**Alexander, 1961**).

4.3 Streptomycétacées

Il existe deux genres dans cette famille : *Streptomyces* et *Micromonospora*.

❖ genre *Streptomyces* renferme plusieurs espèces très répandues dans le sol. Il se reproduit par des conidies en chaîne. L'examen des colonies de *Streptomyces* permet de discerner :

- Le mycélium végétatif très serré, implanté dans le milieu auquel il adhère (leurs colonies sont difficiles à prélever au fil de platine).

- Le mycélium aérien, lâche, d'aspect poudreux, formé d'hyphes portant à leurs extrémités des conidies (**Williams, 1978**).

❖ Le genre *Micromonospora* renferme plusieurs espèces dont la plupart sont thermophiles, et se développent surtout dans les fumiers.

4.4 Actinoplanacées :

Cette famille est représentée par le genre *Actinoplanes* qui est aquatique.

1. Ecosystèmes étudiés

Nous avons choisi d'explorer la biodiversité en actinomycètes de deux écosystèmes extrêmes très mal sinon complètement exploités.

1.1. Le Chott Melghir

Le Chott Melghir (Longitude : 6°30'30" à 6°30'02" Est et Latitude : 34°00' à 34°30'01" N) est situé au Sud-est de la ville de Biskra. Il est limité au Nord par la Daïra de Zeribet El Oued et Sidi Okba, à l'Est par les Wilaya d'El Oued et de Khenchela et à l'Ouest par la Commune d'El Haouch. Avec une superficie de 551.500 hectares il constitue un type assez rare de zone humide semi-permanente dans une région steppique, aride. Le chott Melghir caractérise les régions sahariennes arides et hyper arides et constituent les points les plus bas du Sahara Algérien (-35m d'altitude). On y rencontre des halipèdes, des zones steppiques toujours vertes aux alentours du chott. Au centre, ce sont les sebkhas complètement dépourvues de végétations. Le sol est saturé en sel à cause de la forte évaporation, il devient régulièrement un désert de sel. Ces sols, soit peu évolués ou halomorphes, sont représentés le plus souvent par des hyper halophiles ou gypso-psammophiles.



Photographie1 : Deux Sebkhass du Chott Melghir

1.2. El Oued

La Wilaya d'El Oued (Longitude 006°E53, Latitude033°N20') est située au Sud-est de l'Algérie, elle a une Superficie de 44586.80 Km². Elle demeure une des collectivités administratives les plus étendues du pays. La longueur de sa frontière avec la Tunisie est de 300 Kms environ. Elle est couverte par le grand Erg Oriental sur les 2/3 de son territoire. La configuration du relief se caractérise par trois grands ensembles à savoir : Une région de sable qui couvre la totalité du Souf, ainsi que les parties Est et Sud de l'Oued Righ. Un plateau rocheux qui longe la RN3 et s'étend vers le Sud. Une région de dépression, les zones des chotts qui sont situées au Nord de la Wilaya et se prolongent vers l'Est pour rejoindre le chott Djerrid en Tunisie. La wilaya d'El Oued appartient au Sahara oriental, c'est un large plateau désertique abritant quelques formations du moi-pliocène, érodées. Les clips buttes témoins surélevées de 10 à 50 m représentent les reliefs développés dans la région. La partie sud-est est constituée par les sables du grand erg oriental s'étendant au nord et au sud sur 300 kms environ. Les dunes de sables aux arêtes de "sif" (sabre), forme typique de

relief de ces sables. L'hydrographie de la région est représentée par d'anciens lits d'écoulement qui traversent la wilaya d'El-Oued du Sud vers le Nord, en particulier les Oueds Maya et Righ.

La région d'El-Oued se caractérise par un climat aride de type saharien désertique, en hiver la température baisse au dessous de 0° C alors qu'en été elle atteint 50° C; la pluviométrie moyenne varie entre 80 et 100 mm/an concentrée en une seule période (d'octobre à février). Le Sirocco (vent chaud et sec) peut être observé durant toute l'année. Le Sirocco peu provoqué des dégâts très importants comme les dessèchements et les déshydratations.

2. Prélèvement des échantillons

2.1. Le sel du Chott Meighir

Les prélèvements des échantillons de sel ont été effectués à partir de la Sebka de Chott Melghir dans des conditions d'asepsie rigoureuse. Deux prélèvements ont été effectués (le premier a été prélevé en surface et le second a une profondeur de 22 cm) Les échantillons sont déposés dans une feuille de papier aluminium ensuite placés dans un flacon stérile et transportés jusqu'au laboratoire pour leurs analyses.

2.2. Le sol d'El Oued

Les deux échantillons ont été prélevés à l'aide d'une grande spatule stérile : les cinq premiers centimètres de la couche superficielle du sol sont écartés. 100 à 150 grammes de terre de la couche sous-jacente (entre 5 et 15 cm de profondeur) sont déposés sur une feuille d'aluminium. Les gros débris (pierre, racines etc....) sont écartés, et environ 100 g sont placés dans un flacon stérile et transportés le plus rapidement possible au laboratoire pour analyse (**Pochon et Tardieux, 1962**).

3. Caractéristiques physico-chimiques des échantillons

La qualité physico-chimique du sol est importante à connaître car elle conditionne la diversité de la microflore tellurique. Les caractères physico-chimiques étudiés ont été réalisés dans un laboratoire privé d'analyses microbiologiques et

physico-chimiques du sol. Ils concernent le pH, la conductivité électrique, la salinité, le taux de la matière organique, et la teneur en carbonates et azote totaux.

3.1. Détermination du taux de la matière organique

La matière organique joue un rôle important dans les fonctionnements physique, chimique et biologiques du sol. Elle améliore la cohérence des éléments structuraux, favorise la rétention en eau utile, participe au stockage réversible des éléments nutritionnels, limite le développement de certains parasites, augmente l'aération du sol. La détermination du taux de matière organique est réalisée indirectement, à partir du dosage de la teneur en carbone organique, suivant la méthode normalisée internationale NF ISO 14235. Le taux de matière organique est calculé en multipliant la teneur en carbone par un coefficient stable dans les sols cultivés régionaux, fixé à 1,72 ($MO = C \times 1,72$).

3.2. Détermination du carbone organique

Cette méthode permet le dosage direct du carbone organique par colorimétrie après oxydation de la matière organique par le bichromate de potassium en excès en milieu sulfurique et à 135° C. En effet, la quantité de chrome III+ formée est proportionnelle à la teneur en carbone organique présente dans le sol (**Aubert, 1978**).

3.3. Mesure du pH

La mesure du pH consiste à homogénéiser 10 g de sol dans 25 ml d'eau distillée. Après agitation, à l'aide d'un homogénéiseur pendant 15 minutes et décantation le pH du surnageant est déterminé.

3.4. Mesure de la conductivité de l'extrait aqueux 1/5

La C_E permet de déterminer la salinité d'un sol. 20 g de sol tamisée dans un tamis de 2 mm sont mis en suspension dans 100 ml d'eau distillée. Après une heure d'agitation dans un agitateur rotatif suivie d'une demi-heure de repos, la suspension est ensuite décantée dans un Bécher et la conductivité est mesurée à l'aide d'un conductimètre. Les résultats sont exprimés en mS/cm.

3.5. Détermination de la teneur calcaire actif

La terre est mise en contact avec un réactif spécifique (oxalate d'ammonium), qui attaque une fraction du calcaire total seulement. Le calcium extrait est ensuite dosé. Cette méthode d'analyse courante est décrite dans la norme AFNOR NF X31-106.

3.6. Mesure de la salinité

La salinité est une mesure de la concentration des minéraux dissous dans le sol. Si la valeur est trop basse, les plantes seront sous alimentées; trop haute, les plantes dépériront. Cette mesure se prend en mesurant la conductivité électrique du sol entre 2 électrodes. Plus le courant passe, plus la mesure est élevée plus le sol est considéré riche; l'inverse est également vrai.

3.7. Dosage de l'azote organique

L'azote organique est dosé par la méthode kjeldahl où on transforme l'azote des composés organiques en azote ammoniacal par l'acide sulfurique concentrés, à l'ébullition, qui agit comme oxydant et détruit la matière organique. Le carbone et l'hydrogène se dégagent à l'état de gaz carbonique et l'eau. L'azote transformé en ammoniacque est fixé par l'acide sulfurique à l'état de sulfate d'ammonium. Puis l'ammoniacque est distillée dans une solution d'acide borique. On titre avec une solution d'acide sulfurique à 0.02 N.

4- Isolement des actinomycètes

4.1. Milieux d'isolement

L'isolement d'actinomycètes à partir d'échantillon a été réalisé sur trois milieux différents : AIA, ISP2, et ISP5 (Annexe 1). Après la préparation une partie de chaque milieu a été additionnée de 14 % de NaCl pour favoriser le développement des bactéries halophiles. Afin d'inhiber la croissance des bactéries Gram négatives qui représentent une concurrence pour les actinomycètes, l'acide nalidixiques a été ajouté à une concentration de 10 µg/ml. La nystatine est utilisée comme un agent

antifongique pour éliminer la flore fongique envahissante qui perturbe et empêche les actinomycètes de se développer. Elle est additionnée à une concentration 50 µg/ml (**Larpen et Sanglier, 1989**). Les solutions antibactériennes et antifongiques ont été stérilisées par filtration à travers une membrane de 22 µm de porosité et sont ajoutées stérilement aux différents milieux en surfusion refroidis à 45° C.

4.2. Préparations des dilutions décimales

Pour chaque échantillon, 1g de sol et de sel est introduit dans un tube contenant 9 ml d'eau physiologique stérile, les tubes sont ensuite agités au vortex 4 à 5 minutes, à vitesse maximale. Cette suspension est considérée comme étant la solution mère. Une série de dilutions décimales est ensuite effectuée pour l'échantillon de sol de 10⁻¹ jusqu'à 10⁻⁶, pour l'échantillon de sel de 10⁻¹ jusqu'à 10⁻⁴.

4.3. Ensemencement et incubation

0,1ml de chaque dilution est ensemencé a la surface des boites de pétri contenant l'un des trois milieux de cultures, les boites sont ensuite incubées à 28° C pendant 21 jours.

4.4. Dénombrement

Le dénombrement des colonies d'actinomycètes isolées est effectué quotidiennement, après le 14^{ème} jour d'incubation. Il est réalisé par un appareil de comptage des colonies.

4.5. Purification des souches

Afin d'obtenir des souches pures, les différentes colonies obtenues sont repiquées et ensemencées par la méthode des stries dans des boites de Pétri contenant le même milieu d'isolement, puis incubées jusqu'à croissance à 28°C. Il est recommandé de réaliser le moins de repiquages possibles afin conserver la stabilité génétique des souches.

4.6. Conservation des souches

Seules les colonies à coloration de Gram positive présentant l'aspect filamenteux caractéristique des actinomycètes, sont conservées sur géloses inclinées du milieu ISP5. Les tubes sont incubés à 28° C jusqu'à croissance des souches. Ils sont placés, par la suite dans un réfrigérateur à 4° C (**Suzuki, 2001**).

5. Etude des caractères morphologiques

5.1. Observation macroscopique des colonies

Des observations quotidiennes sont effectuées après la deuxième semaine d'incubation, afin de déterminer l'aspect des colonies isolées. Les caractères macroscopiques observés sont : la couleur, la taille et la forme des colonies isolées. Les actinomycètes sont reconnus par leurs aspects filamenteux et poudreux caractéristique. Ces observations sont facilitées par l'emploi d'un microscope optique au grossissement x 10 (**Williams et Cross, 1971**).

5.2. Coloration de Gram

Les colorations sont effectuées selon les méthodes de Gram classiques. Des frottis de colonies répondant aux caractéristiques macroscopique des actinomycètes sont préparés, colorés puis observés sous microscopes optique au grossissement x 100.

6. Mise en évidence des activités enzymatiques

6.1. Recherche de l'amylase

Ce test est réalisé sur le milieu nutritif gélosé contenant 1% de l'amidon soluble selon la méthode de **Gordon et Smith (1953)**. Après 14 jours d'incubation à 28°C, la gélose est recouverte d'une solution de lugol. L'hydrolyse est mise en évidence par l'absence de coloration autour des colonies à l'inverse les zones contenant de l'amidon qui se colorent en brun.

6.2. Recherche des protéinases

6.2.1. La caseinase

L'hydrolyse de la caséine est étudiée selon la méthode de **Williams et Cross (1971)**. Sur un milieu gélosé contenant 5 % de lait écrémé, les colonies sont ensemencées par stries. L'apparition de toute zone claire autour des colonies après 14 jours d'incubation à 28° C, témoigne de l'hydrolyse de la caséine.

6.2.2. La gélatinase

Les souches sont ensemencées dans des tubes contenant la gélatine nutritive puis incubées à 28°C pendant 21 jours. Les tubes sont ensuite placés une heure au réfrigérateur. Si la gélatine devient solide cela implique qu'elle n'a pas été attaquée par les bactéries, si elle reste liquide, cela implique qu'une enzyme extracellulaire la gélatinase l'a hydrolysé (**Larpen et Larpen-Ghourgoud, 1985**).

6.3. Recherche de la catalase

Prendre une lame propre, déposer sur celle-ci une goutte d'eau oxygénée à 10 volumes. A l'aide d'une pipette Pasteur, émulsionner par un peu de la colonie d'actinomycètes. Le dégagement des bulles de gaz indique la présence d'une catalase (**Camille, 2007**).

6.4. Recherche de la cellulase

Pour chaque isolat d'actinomycète, 2 tubes à essai contenant chacun 9 ml du milieu liquide ISP9 (**annexes 2**) sont utilisés. Une bandelette de 0.5 x 10 cm de papier filtre Whitman N°1 stérile, est introduite dans chaque tube, elle est utilisée comme unique source de carbone et d'énergie. Les tubes ainsi préparés sont ensemencés par 1ml d'inoculum préalablement préparé. Un tube non ensemencé sert de témoin. Les cultures incubées à 28°C pendant 21 jours. L'activité cellulolytique est mise en évidence par la digestion du papier filtre.

6.5. Recherche des lipases

6.5.1. Recherche des estérases

La recherche de l'estérase est réalisée sur le milieu sierra ajouté de tween 80 (**Annexe**). Après 14 jours d'incubation à 28° C, l'apparition d'un halo opaque autour des colonies traduit la présence d'une estérase (**Camille, 2007**).

6.5.2. Hydrolyse de la lécithine et les lipoprotéines

La lécithine est recherchée sur une gélose au jaune d'œuf coulée en boîtes de pétri, ensemencées avec les souches à tester par des touches ou par des stries, puis incubées pendant 1 à 5 jours à 28° C. Le jaune d'œuf est un substrat composé de lécithine, triglycérides et d'une lipoprotéine, il permet donc de rechercher trois enzymes : La lécithine : l'apparition d'un halo opaque, blanc jaunâtre, à bord net sous la colonie ou à la limite, indique la présence d'une lécithinase. Si la lécithinase est absente, toute l'opacité floue à la surface de la colonie indique la présence d'une lipase. La lipoprotéinase est révélée par l'apparition d'un halo clair autour de la colonie.

6.6. Recherche de nitrate réductase

La recherche de nitrate réductase est réalisée sur milieu mannitol-mobilité, après ensemencement et incubation des tubes pendant 1 à 5 jours à 45° C, l'observation s'effectue après l'introduction dans le tubes de quelques gouttes de deux réactif Nitrate réductase 1 et Nitrate réductase 2. Si la surface du milieu se colore en rouge cela indique la réduction du nitrate par l'enzyme nitrate réductase. En cas d'absence de coloration, l'ajout de poudre de zinc dans le tube et l'apparition d'une coloration rose cela indique la présence de nitrite (NO₂), par réduction des nitrates en nitrites par le zinc. Si la pente reste incolore, cela indique que le nitrate est réduit complètement au-delà du stade des nitrites en azote gazeux (**Camille, 2007**).

6.7. Recherche de la pectinase

Ce test est réalisé sur le milieu pectine agar (annexe). Ensemencer les boîtes en

stries après incubation de 5 jours à 28° C (**Camille, 2007**). Les boites sont recouvertes par la solution d'acétate de cuivre et laisser à température ambiante pendant quelques minutes. L'apparition d'un halo claire indique la présence d'une activité pectinolytique.

1. Caractéristiques physico-chimiques des échantillons

Les échantillons étudiés dans ces investigations proviennent de la sebkha de Chott Melghir et du Sol d'El Oued, ils présentent tous des caractéristiques physico-chimiques différentes (**tableau N°5**). Ces facteurs physico-chimiques peuvent jouer un rôle important dans la sélection des microorganismes.

Tableau N°5 : Paramètre physico-chimiques des échantillons du sol d'El Oued et du sel de Chott Melghir

| Echantillons | pH | Conductivité électrique (uS /Cm) | Salinité (g/L) | CaCO3 Actif | Carbone Organique (%) | Matière Organique (%) | Azote (%) |
|--------------------------------|------|----------------------------------|----------------|-------------|-----------------------|-----------------------|-----------|
| Le Sol d'El Oued | 6.98 | 210000 | 90 | 11.70 | 0.31 | 0.55 | 0.027 |
| Le Sel du Chott Melghir | 7.82 | 420000 | 180 | 12.60 | 0.14 | 0.25 | 0.012 |

Il est intéressant de noter que l'ensemble des échantillons examinés représentent des écosystèmes extrêmes par la présence très réduite de végétation et un taux de salinité élevés surtout pour l'échantillon du Chott Melghir. Nos échantillons se caractérisent par des valeurs de pH différentes, l'échantillon du Sel avec un pH est de 7.82 il est par conséquent un sol alcalin, alors que le pH du deuxième échantillon est de 6.98 il tend vers la neutralité. Ces taux de pH sont le résultat de l'accumulation calcaire qui est importante dans ces deux échantillons. L'aridité du climat est également un facteur qui fait augmenter le pH. Dans beaucoup de cas, les carences en oligo-éléments sont généralement dues soit à un pH trop faible (sol acide) ou plus fréquemment à un pH trop élevé (sol alcalin). Ce dernier entraîne la formation d'hydroxydes insolubles (**Rogers et al., 2005**).

D'après **Lee et Hwang (2002)**. Le taux de matière organique (%) dans un sol est considéré comme : faible à des valeurs entre (4.0-7.0) ; modéré (7.1-9.0) et élevé (9.1-11.0). Le taux très bas de la matière organique de nos deux échantillons (0.55%) pour le Sol et (0.25%) pour le Sel nous permet de conclure que la matière organique dans ces échantillons n'existe que sous forme de traces, il est clair que les sols situés en région arides sont pauvres en matière organique. La conductivité électrique, renseigne sur la teneur globale en sels dissous; elle ne

s'applique qu'aux terres salées et aux terres à taux de fertilisation très élevé. (Aubert, 1978). Nos échantillons sont classés parmi les sols très salins.

2. Isolement des actinomycètes

L'isolement de souches d'actinomycètes réalisé à partir de nos échantillons de sol et de sebkha sur les trois milieux sélectifs (AIA, ISP5, et ISP2) additionnées d'antibactérien, d'antifongique et du NaCl pour les Halophiles a conduit aux résultats présentés dans le **tableau N°6**

Tableau N°6 Nombre d'actinomycètes par échantillons de Sol et de Sel et par milieu de culture.

| Echantillons | Nombre de colonie | | |
|-----------------------------|-------------------|------|------|
| | AIA | ISP5 | ISP2 |
| Sol d'El Oued | 2 | 26 | 19 |
| Sel du Chott Melghir | 0 | 9 | 7 |
| Total | 2 | 35 | 26 |

A partir des trois milieux sélectifs utilisés, 63 colonies ont été prélevés. Elles sont repérées d'après leurs aspects macroscopiques, et microscopiques (colonies dures incrustées dans la gélose, aspect filamenteux a coloration de Gram positif). Selon les résultats rassemblés dans le **tableau N°6**, on constate que pour les trois milieux utilisés, il ya une différence importante de nombre de colonie d'actinomycètes isolée des différent échantillons étudiés. Le nombre de colonies isolées est de 47 pour l'échantillon de sol, et 16 colonies pour l'échantillon de sel. Il apparait clairement qu'un nombre plus élevé d'actinomycètes est obtenu à partir de l'échantillon du sol. Ceci peut s'explique par le fait que d'une part l'échantillon de sol est relativement plus riche en matière organique que l'échantillon de sel et

d'autre part, le degré de salinité de l'échantillon du sel est plus élevé que celui du sol. Ceci est corroboré par la bibliographie, le nombre des actinomycètes est corrélé positivement avec le taux de la matière organique quelque soit le taux de la salinité du sol (**Lee et Hwang, 2002**).

Le plus grande nombre de colonies d'actinomycètes est obtenu sur les milieux sans NaCl, en effet le milieu ISP5 sans NaCl s'est montré plus efficace en permettant une bonne récupération d'actinomycètes soit 26 colonies contre 9 pour le milieu ISP5 avec le NaCl. Ceci est vérifié pour le reste des milieux. En effet, 19 colonies ont été isolées pour le milieu ISP2 sans NaCl contre 7 avec le NaCl avec le même milieu. Enfin, 2 colonies ont été récoltées sur le milieu AIA sans le NaCl contre 0 colonies avec le NaCl. Nous proposons dans des prochains travaux similaires d'étudier la bonne concentration du NaCl ajouté aux milieux d'isolement pour un bon isolement de ce type de bactéries.

Malgré la richesse des trois milieux ISP5, ISP2, et AIA en source de carbone, d'azote, et d'éléments sélectif pour la croissance des actinomycètes, les milieux ISP5 et ISP2 avec ou sans NaCl ont permis l'isolement d'un plus grand nombre d'actinomycètes par rapport à L'AIA. Pour cela nous préconisons l'utilisation des milieux ISP5 et ISP2 pour l'isolement des actinomycètes à partir de ces écosystèmes extrêmes

Beaucoup de technique on été utilisées pour l'isolement sélectif des actinomycètes, elles reposent essentiellement sur le traitement à la chaleur des échantillons et l'addition aux milieux d'isolement des substances inhibitrices, stoppant la croissance des germes envahisseurs (**Larpen et sanglier, 1989 ; Ouhdouche et al., 2001 ; Hilali et al., 2002 ; Jung Yeop lee, 2002**). Les avis concernant l'utilisation des antibiotiques sont cependant controversés. Selon **Porter et al., (1960)** la plupart des antibactériens utilisés inhibent beaucoup d'actinomycètes. En revanche, **Dulaney et al. (1955), Williams et Davies (1965)**, recommandent l'utilisation d'un mélange d'antibiotiques et d'antifongiques pour l'isolement des actinomycètes. Dans notre cas, les milieux ont tous été additionnés de nystatine à une concentration de 50 µg/ml et d'acide nalidixique à une concentration de 10 µg/ml. La nystatine ajoutée au milieu a inhibé la croissance des champignons. **Williams et Davis (1965)** ont testé cet antifongique sur des champignons isolé du sol, ils ont constaté qu'il a inhibé leur croissance en majorité à une concentration de 50 µg/ml, et en plus cet antifongique lorsqu'il

est testé sur les actinomycètes n'a pas altéré leur croissance même en augmentant sa concentration à 100 µg/ml. L'addition de l'acide nalidixique a permis l'élimination des bactéries à Gram négatif, il est utilisé dans les travaux de **Takizaw *et al.* (1993)** pour l'isolement des actinomycètes à partir des milieux marins, **Suzuki *et al.*, (1999)** ont trouvé que les actinomycètes peuvent résistés à l'acide nalidixique jusqu'à une concentration de 10ug/ml, au-delà la croissance de certains genres peut être diminuée. Une mixture de la nystatine à 50 ug/ml et de l'acide nalidixique à 10 ug/ml ajoutés aux milieux sélectifs a permis dans notre étude d'éliminer en grande quantité les contaminants et de sélectionner les actinomycètes. Bien que nous ayons pris des précautions, la combinaison d'antibiotiques et d'antifongique utilisée a permis la croissance de quelques petites colonies de champignons (taille réduite et mycélium peu développé). Surtout sur le milieu ISP2. Le problème le plus délicat concerne les bactéries à Gram positif que nous ne pouvons pas éliminer et qui gênent la croissance des actinomycètes par l'envahissement des géloses, c'est le cas de la présence de plages de *Bacillus*.

3. Etude de l'aspect macroscopique et caractères cultureux des actinomycètes isolés

A partir des 63 souches actinomycètes isolées et purifiées, nous avons sélectionné 20 souches sur la base de leurs caractères morphologiques, pour la poursuite de notre travail. Les caractères macroscopiques de ces souches d'actinomycètes présentent des formes des couleurs et des textures différentes (**Tableaux N°7**). Elles sont généralement rondes aux contours irréguliers, opaques qui adhèrent à la surface de la gélose, de différentes couleurs : marron, beige et blanche, cet aspect est caractéristique du mycélium aérien des actinomycètes. L'observation du revers de la colonie (dos de la boîte de pétri) permet de déterminer la couleur du mycélium de substrat qui peut être (beige, marron-foncé).



Photographie N°2 : Aspect macroscopique de quelques colonies isolés des 2 échantillons

Tableau N°7 : Aspect macroscopique et caractères cultureux de quelques colonies isolées à partir des échantillons de la sebkha et de sol

| Isolat | Forme | Taille | Couleur | Aspect de surface |
|--------|-------------|-------------|--------------|--------------------|
| SO1 | Irrégulière | Petite | Blanche | Lisse |
| SO2 | Ronde | Très petite | Blanche | Lisse |
| SO3 | Irrégulière | Très petite | Marron-foncé | Lisse |
| SO4 | Irrégulière | Très petite | Marron-foncé | Incrusté, brillant |
| SO5 | Ronde | Petite | Marron-foncé | Rugueuse |
| SO6 | Dentelé | Petite | Beige | Non incrusté |
| SO7 | Dentelé | Grande | Marron | Incrusté sèche |
| SO8 | Dentelé | Grande | Marron-foncé | Incrusté sèche |
| SO9 | Dentelé | Petite | Blanche | Lisse, poudreuse |
| SO10 | Ronde | Grande | Beige | Laiteuse crème |
| SO11 | Ronde | Grande | Beige | Incrusté |

4. Etude de l'aspect microscopique après coloration de Gram

D'après la coloration de Gram, l'observation microscopique montre que la plupart des souches d'actinomycètes isolées et purifiées sont des bactéries filamenteuses à coloration de Gram positive. Les actinomycètes se présentent sous forme de filaments fins, ramifiés et enchevêtrés, ces filaments se fragmentent pour certains ou pas pour d'autre en élément bacillaires ou ovoïdes. Ils sont regroupés quelques fois en masse pour former des thalles denses où la coloration est très apparente. Il est signalé après ces résultats, que les travaux sur l'isolement des actinomycètes sont un peu spéciaux, en effet, il ne faut jamais écarter certaines colonies sous prétexte que l'aspect macroscopique ne ressemble pas aux actinomycètes. Il est impératif d'abord, de réaliser une observation microscopique après coloration de Gram.

5. Mise en évidence de certaines activités enzymatiques des isolats d'actinomycètes

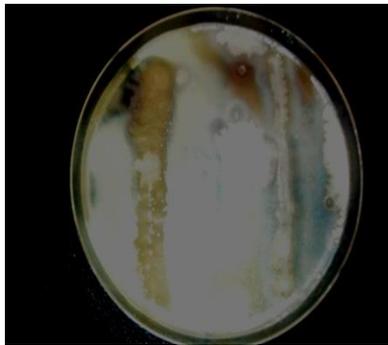
Les résultats des activités enzymatiques des 20 souches sélectionnées sont illustrés dans le tableau ci-dessous.

Tableau N°8 : Résultats des activités enzymatiques des 20 souches sélectionnées

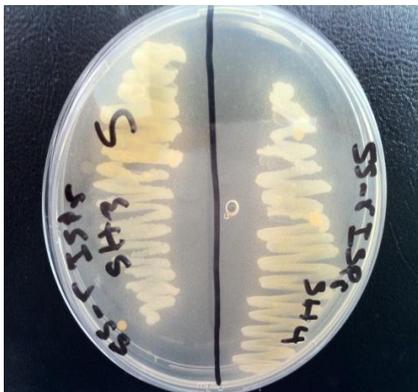
| | S1 | S2 | S3 | S4 | S5 | S6 | S7 | S8 | S9 | S10 | S11 | S12 | S13 | S14 | S15 | S16 | S17 | S18 | S19 | S20 |
|--------------------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Catalase | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Amylase | - | - | - | - | + | + | + | + | + | + | + | + | - | - | + | - | - | - | + | + |
| Pectinase | - | - | - | + | + | + | + | + | + | + | - | - | + | - | + | - | - | + | + | + |
| Gelatinase | + | + | - | - | + | + | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Caseinase | - | - | - | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | - | + | - | - |
| Esterase | + | + | - | - | + | + | + | + | + | - | + | + | + | + | + | + | + | + | - | - |
| Cellulase | + | - | + | + | - | - | + | + | + | + | + | - | - | + | + | + | + | + | + | + |
| Lécithinase | - | - | + | + | + | + | + | + | + | - | + | + | + | - | + | + | + | + | - | + |

5.1 Activité Catabolisme des lipides

La majorité de nos souches sont productrice d'enzymes qui dégradent les lipides et produisent plus spécialement trois enzymes lipolytiques à savoir l'estérase, la lécithinase et la lipoprotéinase (**photographie N°3 et 4**). Différentes lipases sont ont été mises en évidence dans espèces appartenant aux actinomycètes il s'agit principalement de *Streptomyces fradiae* (Sztajer *et al.*, 1988), *Streptomyces coelicolor* (Hou *et al.*, 1988).



Photographie N°3 : Résultat de l'activité lypolytique des souches d'actinomycètes sur milieu gélosé au jaune d'œuf.



Photographie N°4: Résultat de l'activité de l'estérase sur les souches d'actinomycètes testés sur le milieu sierra au tween 80

5.2 Activité pectinolytique

D'après ces résultats, 12 isolats parmi les 20 souches présentent une bonne activité pectinolytique. Les autres souches ne possèdent pas cette aptitude (**photographie N°5**). Dans des travaux précédents, la production d'enzymes pectinolytiques a été mise en évidence par quelques genres d'actinomycètes tel que : *Micromonospora*, *Microbispora*, *Actinoplanes*, *Streptosporangium* et *Streptomyces* (Demain et Solomon, 1985 ; Sanglier *et al.*, 1993).

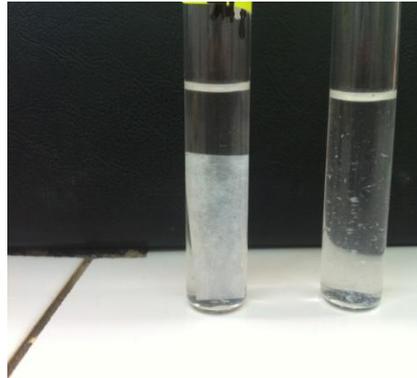


Photographie N°5 : Résultat de l'hydrolyse de la pectine sur les souches d'actinomycètes sur le milieu pectine-agar.

5.3 Activité cellulolytique

Les résultats de l'utilisation de la cellulose par les 20 souches d'actinomycètes testées figurent dans le **tableau N°8**, 15 souches présentent une activité cellulolytique sur le milieu ISP9 liquide contenant de la cellulose comme seule source de carbone et d'énergie. Cela se traduit par une digestion du papier Whatman N°1 (**photographie N°6**) indiquant que les souches testés possèdent l'enzyme responsable de l'hydrolyse de la cellulose (cellulase). Ces enzymes sont généralement produites par les actinomycètes, en particulier les espèces thermophiles et les streptomycètes (Sanglier, 1993). Ces enzymes ont été utilisées dans plusieurs domaines en biotechnologie comme dans les industries alimentaires, l'industrie du textile (Ando *et al.*, 2002), la bioconversion des déchets cellulosiques, l'industrie du papier, et des additifs, dans l'alimentation animale, des aides digestives dans le domaine thérapeutique

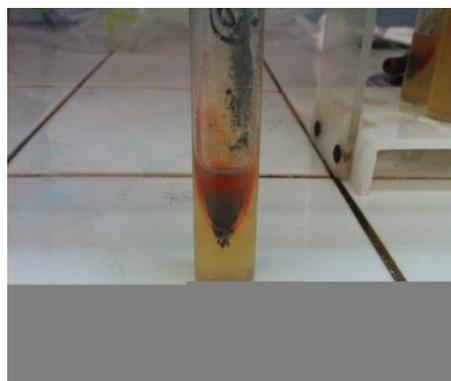
et plus récemment pour la production de biocarburant (Sukumaran *et al.*, 2005).



Photographie N° 6: Résultat de l'activité cellulolytique des souches d'actinomycètes sur milieu liquide ISP9 contenant une bandelette de papier Whatman N°1.

5.4 Teste de nitrate réductase

Les résultats de la réduction du nitrate par les souches d'actinomycètes testé figure dans le **Tableau N°8** on constate que parmi les 20 souches testé seulement 9 présentent une réduction du nitrate sur le milieu mannitol-mobilité-nitrate. Cette activité est traduite par une réaction colorée en rouge après l'ajout des deux réactifs qui sont le nitrate réductase 1 et le nitrate réductase 2 (**photographie N°7**). Cela expliqué par la présence de nitrite et les 9 souches ont réduit le nitrate en nitrite par l'utilisation des nitrates réductases. La présence de nitrate dans le sol est issue des rejets des collectivités locale, de l'industrie et principalement de l'agriculture suite à l'épandage des doses massives d'engrais azotés et de lisier (effluents d'élevage). Les nitrates constituent aujourd'hui la cause majeure de pollution des grands réservoirs d'eau souterraine et du sol dans le globe.



Photographie N° 7: Mise en évidence de la nitrate réductase sur le milieu mannitol-mobilité-

nitrate.

5.5 Activité protéolytique

Le **Tableau N°8** nous montre 12 résultats positifs sur les 20 souches testées, elles ont une croissance modérée sur le milieu caséine à extrait de levure et au glucose ainsi l'apparition de toute zone claire autour des colonies témoigne de l'hydrolyse de la caséine (**photographie N°8**) Ces résultats sont en accord avec ceux présentés par **Gulve et Deshmukh (2011)** pour l'étude des activités enzymatiques des actinomycètes isolés à partir des sédiments marins, ou ils ont montré que les genres *Streptomyces*, *Micromonospora*, *Nocardia*, *Saccharopolypora* possèdent une activité protéolytique. Ainsi que les travaux de **Kurup et al., (1975)** qui montrent la capacité d'une nouvelle souche d'actinomycètes thermophile Thermophile *Thermoactinomyces candidus* à dégrader la caséine. Pour l'hydrolyse de la gélatine, on constate que 17 sur 20 sont positifs, ce qui se traduit par la liquéfaction de la gélatine par une enzyme extracellulaire qui est la gélatinase après l'emplacement des tubes environ une heure à +4°C (figure). Ces résultats sont similaires à ceux trouvés par **Djaballah (2010)** dont il a assigné la liquéfaction de la gélatine par des souches halophiles et halotolérants isolés de la sebkha d'Ain M'Lila qui sont proches des genres *Actinopolyspora*, *Streptoaloteichus*, *Streptosporagium*, *Kitasatospora*, les travaux de **Iwasaki et al (1981)** ont montré également que *Streptomyces sannanensis* liquéfie la gélatine à 4°C pendant 1 heure.



Photographie N°8 : Résultats des tests sur les souches à pouvoir protéolytiques, (à gauche dégradation de la gélatine et à droite la dégradation de la caséine)

5.6 Activité amylolytique

A partir du **Tableau N°8** on remarque que 11 souches sur 20 présentent une activité amylolytique sur le milieu à base d'amidon. Après addition du Lugo, l'apparition d'un halo clair autour de la colonie traduit la dégradation de l'amidon (**Photographie N°9**), cela montre que les souches testées possèdent une amylase. Ces résultats ressemblent à ceux présentées par **Kuo et Hartman (1966)**, qui ont montré la production des amylases thermophiles par les souches de *Thermoactinomyces vulgaris*. Nos résultats montre que cette enzyme est produite par des actinomycètes thermophiles à une température de 45° C comme il a été démontré que cette dernière est produite par une espèce thermophile (*Thermobifid NTU22*) vivant à une température optimale de 60° C (**Chao et Wen, 2007**).



Photographie N° 9: Test de l'hydrolyse de l'amidon par des souches d'actinomycètes.

5.7 Activité de la catalase

Le teste de la catalase montre un résultat positif pour toutes les souches (**tableau N°8**). La présence de la catalase est détectée par la production de bulles d'air lors d'un contacte de la culture avec l'eau oxygénée (**photographie N°10**). Les actinomycètes sont aérobies et ont normalement toute une catalase. S'il avait eu des résultats négatifs, cela mériterait plus d'attention.



Photographie N°10 : Résultat positif de la catalase d'une souche actinomycétale

Conclusion et perspectives

L'objectif essentiel de notre travail était d'étudier la biodiversité métabolique des actinomycètes provenant des écosystèmes extrêmes ou les conditions physicochimiques sont défavorables à la vie microbienne (sol arides, salinité extrême...).

Pour cela il nous a fallu pratiquer un isolement à partir des échantillons provenant de nos écosystèmes explorés (Sol d'El Oued et Sel du Chott Melghir), ainsi 63 colonies actinomycétales ont été isolées à partir de ces deux sites. Certains de ces isolats présentent des aspects macroscopiques caractéristiques des actinomycètes. Ces isolats, apparaissent après observation microscopiques, Gram positif sous formes filamenteuses très ramifiés caractéristique des actinomycètes. Dans cette étude les observations macroscopiques utilisées couramment n'étant pas suffisantes nous avons mis l'accent sur l'observation microscopique pour l'ensemble des isolats obtenus.

L'emploi de plusieurs milieux sélectifs pour l'isolement des actinomycètes est nécessaire afin d'isoler le maximum de ces bactéries. En effet les 63 colonies obtenues dans cette étude, ont été isolés à partir du milieu ISP5 et ISP2. Le AIA n'a permis d'isolés que 2 colonies, la variation des milieux de culture est donc très importantes.

Parmi les 63 colonies isolées et purifié, 20 ont été sélectionnés dont 3 souches proviennent du sel, et les 17 autre proviennent du sol, les souches des échantillons du sel ont dégradé presque tous les composé sauf l'amidon et la pectine, et seulement la nitrate reductase na pas été dégradé par les souches provenant du sol. Sur l'ensemble des 20 souches testées la totalité présente une activité positive sur la catalase, 75 % des souches présentent une activité cellulolytique, 60 % sont pectinolytique, 75 % sont estérase positif, 60 % ont une Caseinase, la gélatine est dégradée à 85 %, la lipoprotéinase est catabolisée à 60 %, seulement 45% des souches réduisent le nitrate en nitrite. La lécithinase est dégradé à 75 %. et 55 % sont amylolique. Ces résultat sont très encourageants et ouvrent des perspectives dans le domaine de la recherche médicale et industriel où ces enzymes provenant des actinomycètes extrémophiles peuvent largement contribuer.

Considérant ces résultats satisfaisant nous espérons continuer nos travaux dans ces régions arides, et surtout le site du Chott Melghir qui constitue a nos yeux un site extraordinaire puisqu'il est situé à -35 m d'altitude et de se fait constitue l'un des point les bas en plein

Sahara.

Références bibliographique

Al-Zarben S. S., Al-Musllam A. A^ Abbas L, Staackebrandt E. and Kroppenstedt R.M.,(2002). Saccharomonospora halophila. Sp. Nov., A novel halophilic act Inomycete isolated from marsh soil in Kuwait. *Int. J. Sys. Ev. Microbiol.* **52:** 555-558.

Alexander. (1961). Introduction to soil microbiology. John Wiley, New York.

Ando S. Ishia H. Kosugi Y. and Ishiakawa K., (2002) Hyperthermostable Endoglucanase from Pyrococcus horikoshii. *Applied and Environmental Microbiology.*68(1): 430-433.

Becker B., Lechevalier M. B. and Lechevalier H. A., (1965). Chemical composition of cell-wall preparation from strains of various from genera of aerobic actinomycetes. *Appl. Microbio.* 13: 236-243

Basilio A., Gonzalez I., Vincente M. F., Gorrochategui J., Cabello A., Gonzalez A. and O. Genilloud O. (2003). Patters of antimicrobial activities from soil actinomycetes isolated under different conditions of pH and sanity. *J. Appl Microbiol.*, 95.814-823.

Benimeli C. S., Amoroso M. J., Chaile A. P., Castro G. R. (2003). Isolation of four aquatic *streptomycetes* strains capable of growth on organochlorine pesticides. *Biores Technol.* 89, 133-138.

Chun J., Blackatl L. L.,Kang S., Hah Y. C. and Goodfellow M., (1997). Aproposal to reclassify Nocardia pinensis Blackall *et ai.* As Skermania piniformis *gen. Nov. Comb Nov Int. J. Syst. Bact.* **47:** 127-131.

Chun J., Bae K.S., Moom E.Y., Jung S.O., Lee H.K. and Kim S.J. (2000). Nocardiosis kunsanensis sp. nov., a moderately halophilic actinomycete isolated from a saltem. *Int. J . Sys. Ev Microbiol.*, 53.1907-1915.

Camille D., (2007). Microbiologie pratiques pour le laboratoire d'analyse et de controle sanitaire. Lavoisier. 126-173.

Chao-Hsun Y., Wen-Hsiung L., (2007). Cloning and characterization of a maltotriose-produing a-amylase gene from *Thermobifida fusca*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 34 (4): 325-330.

De Boer W., Gunnewiek P.J.A.K., Lafeber P., Janse J.D., Spit B.E. and Woldendorp J.W. (1998). Anti-fungal properties of chitinolytic dune soil bacteria. *Soil Biol. Biochem. Vol. 30. No. 2. Pp. 193-203.*

Dulaney E.L., Larsen H.A. and Stapley E.O. (1955). A note on the isolation of microorganisms from natural sources. *Mycol.* **47,** 420.

Demain A, L. and Solomon N. A., (1985). Biologie of industrial microorganisms Cummings publishing company, *Inc.* 291-357.

- Djaballah C. E., (2010).** Biodiversité des actinomycètes halophiles et halotolerants isolées de la sebkha d'Ain M'Lila. Université de Constantine. Algerie. 28-64
- Ensing J. C, (1978).** Formation,properties and germination of actinomyces spores. *Amu. Rev. Microbio.* 32: 185-219.
- Freitas Y. M. and Blat J. V., (1954).** Micro-organisms associated with the deterioration of fish-nets and cordage. *J. Univ. Bombay*, 23:53-59.
- Gottlieb D., (1973).** General consideration and implication of the Actinomycetales In: Actinomycetales. Characteristics and pratical importance. Edited by G. Sykes and F. A. Skinner. Academic Press, London,NewYourk.
- Goodfellow M. and Williams S. T., (1983).** Ecology of actmmmycetes. -*Ann. Rev. Microbial.* 37.189-216.
- Gazenko S. V., Reponen T. A., Grinshpan S. A., Willeke IC, (1998).** Analysis of airborne actinomyeete spores with flurogenic substrates. *Applied and Environmental Microbiology.* **64:4410-4415.**
- Gottlieb D. (1974).** Actinomycetales. In : Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Eds: R.E. Buchanan et N.E. Gibbons, 8th Ed. The Williams and Wilkins Company, Baltimore. 657-881.
- Garrity G.M., Bell J.A. and Lilburn T.G. (2004).** Taxonomic Outline of the prokaryotes. In :Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Second Edition. Springer-Verlag. New York.
- Gordon R. E. and Smith M. M., (1953).** Rapidly growing, acid fast bacteria Species descriptions of *Mycobacteriimu J. Bacteriol.* **66:** 41-48.
- Gulve R. M. and Deshmukh A. M., (2011).** Enzumatic activity of actinomycetes isolated from marine sediments. *Recent Reserch in Science and technology.* **3(5),** 80-83.
- Humm H. J. and Shepard K. &, (1946).** Three new agar digesting actinomycetes. *Duke. JJniv. Marine Station Bull,* 3: 76-80.
- Haamsuu J.P., (2002).** Demethyl (C-1 1) cezomycin a novel calcimycin antibiotic from the symmbiotic, Nj fixing actinomyeete Frankia. Academic Dissertation in General Micribiologie. Helsinki.
- Huang Y., Cui Q., Wang L., Rodriguez C Quintana E., Goodfellow M. and Liuz. (2004).** *Streptacidiphilus jiangxinensis sp. nov.*, a novel actinomycete isolated from acidic rhizosphere soil in china. *Antonie van Leeuwenhoek*, 86.159-165.

Hilali L., Khattabi A., Nssarlah N., Malki A., Finance C, (2002). Isolement des nouvelles souches d'actinomycetales productrices de substances antifongiques a partir du milieu naturel Marocain. *Rev. Biol. Biotech.* 2: 49-53.

Hou C. T. (1994). PH dependence and thermostability of lipases from cultuira floui culture collection. *J. Ind Microbiol.* 13: 242-248.

Holt J.G., Krieg N.R., Sneath P.H.A., Staley J.T. and Williams S.T. (1994). Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Williams and Wikins.

Iwai Y., Takahashi Y. (1992). "Selection of microbial sources of bioactives compounds" in «The search for bioactive compounds from microorganisms», *Spring- Verlag*, NewYork, (Ed.), pp. 281-302

Iwasaki A. Itoh H. Mori T., (1981). Streptomyces sannanensis sp. Nov. International Journal of Systematic Bacteriology. **31(3)**, 280-284.

Jung Y.L, Byung K.H. (2002). Diversity of antifungal actinomycetes in various vegetative soils of Korea. *Can. J. Microbiol.* **48**, 407-417.

Kuo M.J. and Hartman P.A. (1966). Isolation of amyolytic stains of *Thermo-actinomyces vulgaris* and production of thermophilic actinomycete amylases, *J. Bacteriol.* Vol. 92.No.3

Kim B., Al-Tai A.M., Kim S.B., Somasundaram P. and Michael Goodfellow M.(2000). Streptomyces thermocrophilus sp. nov., a cellulase-free endo-xylanase-producing streptomycete. *Int. J. Sys. Ev. Microbiol.*, 50.505-509.

Krasilnikov.(1958). Soil Microorganisms and higher plants office of technical services. US. Dept of commerce. Washington.

Kurup V. P. Barboriak J. J. Fink J. N. and Lechevalier M. P., (1975). Thermoactinomycescandidus, a new species of thermophilic actinomycètes. *International Joournal of Sytematic Bacteriology.* 25(2), 150-154

Larpent J. P. et Sanglier J. J., (1989). Biotechnologie des antibiotiques. Masson. Paris.

Lechevalier M.P. and Lechevalier H., (1985). "Biology of actinomycetes not belonging to genus *Streptomyces* In: Biology of industrial microorganisms. The Benjamen Cummings Publishing Company, INC. 315-360.

Leclerc EL, Guillaume J_M Watter P., (1977). microbiologie appliquee. 67-71.

Lee J.Y. and Hwang B.K., (2002) Diversity of antifungal actinomycetes in varous vegetative soils of korea. *Cam. J. Microbiol.* 48.407-417.

Li X. (1997). *Streptomyces cellulolyticus* sp. nov., a new cellulolytic member of of the genus Streptomyces. *Int.J. Sys. Bact.*, p. 443-445.

Li W.J., Kroppenstedt R.M., Wang D., Tang S.K., Lee J.C., Park D.J., Kim C.J., Xu L.H. and Jiang C.L. (2006). Five novel species of the genus *Nocardiopsis* isolated from hypersaline soils and emended description of *Nocardiopsis* isolated from hypersaline soils and emended description of *Nocardiopsis salina* Li et al. 2004. *Int J. Sys. Ev. Microbil.*, 56.1089-1096.

Larpent J. P. et Larpent-Gonrgaud M., (1985). Manuel pratique de microbiologie. Hermann. Paris. 157-162.

Mincer, T. J., Jensen, P. R, kauffman, C. A. and Fenical, W., (2002). Widespread and persistent populations of a major new marine actinomycete taxon in ocean sediments *AppL Environ Microbiol.* 68: 5005-5011.

Nonomura, H. and Ohara, Y. (1969). The distribution of Actinomycetes in soil. VI. Aselective plate-culture isolation method for *Microbispora* and *Streptosporangium* strains. Part I. *J. Ferment. Technol.* 47: 463–469.

Omura S., (1992). The research for bioactive compounds from microorganisms. Springer, verlag, New York.

Oskay M., Tamer A.U. and Azeri C (2004) Antibacteria activity of some actinomycetes isolated from farming soils of Turkey. *African Journal of Biotechnology.* Vol.3 (9), pp. 441-446.

Olsen. 1960. Personal communication.

Ouhdouch Y., Barakate M. and Finance C. (2001). Actinomycetes of maroccan habitats:isolation and screening for antifungal activities. *Eur. J. Biol.* 37, 69-74.

Prescott L. M., Harley J. P., Klein. D. Au, (2003). *Microbiologie.* De Boeck and Larcier. Franee,

Prescott L. ML, Harley J. and Klein D. A ^ (2007). *Microbiologie. Edition de boeck et lancier*

Petrosyan P., Garcia-Varela M., Luz-Madrigal A., Huitron C. and Flores M.E. (2003). *Streptomyces mexicanus sp. nov.*, a xylanolytic microorganism isolated from soil. *Int. J.Sys. Ev. Microbiol.*, 53.269-273.

Pochon J. et Tardieux P. (1962). Techniques d'analyses en microbiologie du sol. Edition de la tourtourelle, Saint Mandé. 110-111.

Porter J.N., Wilhem J.J. and Tresner H.D. (1960). Method for the preferential isolation of actinomycetes from soil. *Appl. Microbiol.* 8,174.

Syker G. and Skinner F.A. (1973). Actinomycetales: Characteristics and pratical importance. Academic press. London. New York.

Suntari M., Lignell U., Hyvarinen A. and Nevalailen A., (2002). Media for cultivation of indoor *streptomyces.* *J. Microbiol. Meth.* 1668-1674.

Stackebrandt E. Rainey F.A. and Ward-Rainey N.L. (1997). Proposal for a new hierarchic classification system, *Actinobacteria* classis nov. *j. Syst. Bacteriol.* **47**, 479-491.

Sztajer H., Maliszewska L, Weiczorek J., (1988). Production of exogenous lipase by bacteria, Fungi and actinomycetes enzyme. *Microbiol. Technol.* **10**: 492-7.

Snaiki J.Nadif A. et Ouhssine M.,(2006). Détection Biochimique d'*Erwinia carotova* *subsp.* Cartovora de tubercules de betterave sucrière atteints de pourriture. Bordeaux.**145**, 53-60

Shirling E.B. and Gottlieb D. (1966). Methods for characterisation of *Streptomyces* species. *Intern. J. Syst. Bacteriol.* **16(3)**, 313-340.

Suzuki S.I., Okuda T. and Komatsubara S. (1999). Selective isolation and distribution of *Sporichthya* strains in soil. *Appl. Env. Microbiol.* **65(5)**, 1930-1935.

Sanglier J. J., Wellington E. M. IL, Kamoun A., Kelly C., Mercer D. K., Prinzi S. and Tngo C, (1993). Novel bioactive compound from Actinomycetes. *Res. Microbiol.* **144**: 661-663.

Sukumaran R. K, Singhania R. R., and Pandey A., (2005). Microbial cellulases- production, application, and challenges. *Journal of Scientific and industrial Research.* **64**, 832-844.

Tresner H.D., Hayes J.S and Backus E.J. (1968). Differential tolerance of *Streptomyces* to sodium chloride as a taxonomic tool. *Appl. Microbiol.* **16**: 1134-1136

Takizawa M., Cowell R.R. and Hill R.T. (1993). Isolation and diversity of Actinomycetes in the Chesapeake Bay. *Appl. Environm. Microbiol.* **144**, 647-651.

Williams S. T., Locei R., Beswick A., Kurtboke D. L, Kurznetsov V. D., Le Monnier F. J et al, (1993). Detection and identification of novel actinomycetes. *Resources of Microbiology.* **144**:653-656.

Waksman S. A., (1963). Ma vie avec les microbes. Albin Michel. 280p

Wang L., Huang Y., Liu Z., Goodfellow M. Rodriguez C., (2006). *Streptacidiphilus oryzae* sp. nov., an actinomycete isolated from rice-field soil in Thailand. *Int. J.Sys. Ev. Microbiol.*, 56.1257-1261.

Williams ST. (1978). Streptomyces in soil ecosystem. In Mordarski M, Kurylowicz W, Jeljaszewicz J (eds) *Nocardia and Streptomyces*. Warsaw. October 1976. Gustav fischer Verlag, Stuttgart; 137-142.

Willams S.T. AND Cross T. (1971) Methods in microbiology. Academic press, London. **4**, 295-334.

Williams S.T. and Davies F.L. (1965). Use of antibiotics for selective isolation and enumeration of actinomycetes in soil. *J. Gen. Microbiol.* **38**, 251-261.

Yoshida M., Matsubara K., Kudo T. and Horikoshi K. (1991). *Actinopolyspora mortivallis* sp. nov., a moderately halophilic actinomycete. *Int J.Syst. Bact.* P. 15-20.

ZoBell C. E_M (1946). Action of microorganisms on hydrocarbons. *Bacteriol. Rev.* **10**: 1-49.

Annexe1

Milieux de cultures

Milieu ISP5

| | |
|---------------------------|---------|
| Glycérol | 10 g |
| L-Asparagine | 1 g |
| Solution d'oligo-éléments | 1 ml |
| Eau distillée | 1000 ml |
| Agar | 20 g |

pH = 7,0-7,4

Milieu ISP2

| | |
|-------------------|---------|
| Extrait de levure | 4 g |
| Extrait de malt | 10 g |
| Glucose | 4 g |
| Eau distillée | 1000 ml |
| Agar | 20 g |

pH = 7,3

Milieu AIA

| | |
|-----------------------|--------|
| Sodium Caseinase | 2.0 g |
| Asparagines | 0.1 g |
| Sodium Propionate | 4.0 g |
| Dipotassium Phosphate | 0.5 g |
| Magnesium Sulfate | 0.1 g |
| Ferrous Sulfate | 1.0 mg |
| Agar | 15.0 g |

Annexe 2

Milieu Pour Les Tests Enzymatiques

Milieu Isp₉

| | |
|---|--------|
| (NH ₄) ₂ SO ₄ | 2.64g |
| KHPO ₄ | 2.38g |
| K ₂ HPO ₄ 3H ₂ O | 5.65g |
| MGSO ₄ 2H ₂ O | 1g |
| Solution saline | 1ml |
| Eau distillée | 1000ml |

Ph=6,7-8

Milieu Amidon Agar

| | |
|-------------------|-----|
| Peptone | 10g |
| Extrait de viande | 05g |
| Sodium chlorure | 05g |
| Amidon de riz | 10g |
| Agar | 15g |

PH=7

Milieu gélatine

| | |
|--------------------|------|
| Peptone | 10g |
| Extrait de viande | 4g |
| Sodium de chlorure | 2.5g |
| Gélatine | 120g |

PH=6.8 à 7

Solution Saline

| | |
|-------------------------------------|-------|
| CuSO ₄ 5H ₂ O | 0,64g |
| FeSO ₄ 7H ₂ O | 0,11g |
| MnCL ₂ 4H ₂ O | 0,79g |
| ZnSO ₄ 7H ₂ O | 0,15g |

Eau distillée 100ml

Milieu De Sierra Au Tween 80

Peptone 10g

Chlorure de sodium 5g

CaCl₂ 0.1g

Agar 15g

Après autoclavage ajouter 100ml d'une solution

aqueuse à 10 de tween 80 à 900 ml de milieu gélosé

Milieu gélose Au Lait

Peptone pancréatique 10g

Extrait de viande 10g

chlorure de sodium 5g

Agar 20g

Eau distillée 1000ml

Milieu Mannitol-Mobilité-Nitrate

Peptone 5g

Extrait de viande 3g

KNO₃ 1g

Agar 12g

PH=7.2

Pectine Agar

Pectine 5g

Extrait de levure 5g

Eau distillée 1000ml

Agar 20g

PH=7,0

N.B. l'ajustement du PH des milieux de cultures s'effectue à l'aide d'une solution de NaOH 1N ou Solution d'HCL 1Nselon le cas.

هذه في (Melghir شط الملح والواد التربة) المدقع الإيكولوجية النظم من اثنين من عينتين واستخدمت تسعة اعتقالهم تم قد كان وبالتالي، والفطريات للجراثيم مضادة وأضاف (ISP2، AIA ISP5)، الدراسة مع الوسائط هذه تليق تم. لالشعاعية الانتقائي الإعلام وسائل ثلاث من المستعمرات الشعوات وستون تم وقد لعزل استخدمت التي نفسها الإعلام وسائل على الضغوط من وتنقيته. والملح التربة من عينات اختبار تم البكتيريا، هذه من الأنزيمية الأنشطة. الأنزيمية أنشطتها سلالات لاختبار عشرين اختيار قادرة ليست ولكنها الكاتلاز، نشاط كل سلالات أظهرت. النشاط فحص لكل محددة الإعلام وسائل باستخدام ل: الحفاز عمل سلالات معظم تظهر بينما العظمى، الغالبية لفي والنترت النترات من الحد على السليلوز الأميليز، lipoprotéinase ويسيئيناز البكتين، والنشا، الجيلاتين، Melghir شط الصحراء سول الأنزيمية، والأنشطة، Actinomycetes الشعيات: الرئيسية الكلمات

RESUME

Deux échantillons provenant de deux écosystèmes extrêmes (sol d'El Oued et sel de Chott Melghir) ont été utilisées dans cette étude. Ainsi, soixante neuf colonies actinomycétales ont été prélevées à partir de trois milieux sélectifs pour les actinomycètes (ISP5, ISP2, AIA) additionnés d'antibactérien et d'antifongique. Ces milieux ont été ensemencés par ces échantillons de sols et de sel. Les souches ont été purifiées sur les mêmes milieux qui ont servi pour l'isolement. Vingt souches ont été sélectionnées en vue de tester leurs activités enzymatiques. Les activités enzymatiques de ces bactéries, ont été testées en utilisant des milieux spécifiques pour chaque test d'activité. Les souches présentent toutes une activité sur la catalase, mais ne sont pas capable de réduire le nitrate en nitrite dans leur grande majorité, tandis que la plupart des souches présentent une action catalytique sur : la gélatine, l'amidon, la pectine, la Lécithinase, la lipoprotéinase, l'amylase, la cellulose.

Mots clés : Actinomycètes, activités enzymatiques, Sol désertique, chott Melghir

Abstract

Two samples from two extreme ecosystems (soil and El Oued salt Chott Melghir) were used in this study. Thus, sixty nine Actinomycetales colonies were picked from three selective media for actinomycetes (ISP5, ISP2, AIA) added antibacterial and antifungal. These media were inoculated with samples of soil and salt. The strains were purified on the same media that was used for isolation. Twenty strains were selected to test their enzymatic activities. The enzymatic activities of these bacteria, were tested using specific media for each activity assay. The strains all showed catalase activity, but are not capable of reducing nitrate to nitrite in the vast majority, while most strains show a catalytic action to: gelatin, starch, pectin, lecithinase The lipoprotéinase, amylase, cellulose.

Keywords: Actinomycetes, enzymatic activities, Sol desert Chott Melghir