

République Algérienne Démocratique et Populaire

Université Abdelhamid Ibn  
Badis-Mostaganem  
Faculté des Sciences de la  
Nature et de la Vie



جامعة عبد الحميد بن باديس  
مستغانم  
كلية علوم الطبيعة و الحياة

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

## MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDES

Présenté par

M<sup>elle</sup> MESSAOUD HADJA

Pour l'obtention du diplôme de

### MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

**Spécialité : GENETIQUE FONDAMENTALE ET APPLIQUEE**

#### THÈME

**Contribution à l'étude cinétique des extraits  
enzymatiques de quelques souches de *Streptomyces sp*  
isolées du sol de la région de Mostaganem**

Soutenu publiquement le 09 /07/2018

DEVANT LE JURY

Président : Dr. CHIBANI ABDEWAHAB	: M.C.A	Univ. Mostaganem
Encadreur : Dr TISSOURAS FATIHA	: M.C.A	Univ. Mostaganem
Examinatrice: Dr NABACHE SALIM	: M.C.A	Univ. Mostaganem

Année universitaire 2017/2018

## *Remerciements*

*Avant toute chose,*

*Je remercie « Allah » qui m'a donné la force et la volonté pour terminer ce modeste travail.*

*Le thème a été proposé par Dr Tissouras F. Maitre de conférences à la faculté des SNV Université de Mostaganem. Sous sa direction le travail a été réalisé dans des laboratoires de Microbiologie 1 et de biochimie 2 du département de biologie, université de Mostaganem.*

*Je tiens à lui exprimer mes profondes gratitude pour ses encouragements, ses conseils et sa disponibilité sans limite, qui ont contribués à ma formation et qui m'ont permis de mener à bien ce travail.*

*Nos s'incères remerciements vont aux Messieurs :*

- *Dr A. Chibani enseignant et maitre de conférences au département de biologie , de la faculté SNV d'avoir accepté de présider le jury ;*
- *Dr S. NABACHE enseignant au département de biologie de la faculté SNV université de Mostaganem, d'avoir accepté d'examiner le travail.*
- *Que ce mémoire soit l'occasion d'exprimer nos s'incères remerciements à toutes les personnes des laboratoires qui ont contribués de loin ou de près.*

## *DEDICACES*

On tient à dédier ce travail à :

❖ A MON CHERE PERE : **Ahmed**

Qui ne cesse constamment de m'entourer de son affectation grandissant, de m'enrichir de son expérience, de me prodiguer ses conseil, et qui m'a permis de mieux comprendre la vie.

Je vous dédie ce travail en témoignage de ma reconnaissance infinie pour les énormes sacrifices consentis à mon éducation.

❖ A MA TRÈS CHER MERE : **Halima**

Aucune dédicace ne saurait exprimer mon respect, mon amour éternel et ma considération pour les sacrifices que vous avez consenti pour mon instruction et mon bien être.

Je vous remercie pour tout le soutient et l'amour que vous me portez depuis mon enfance et j'espère que votre bénédiction m'accompagne toujours.

Que ce modeste travail soit l'exaucement de vos vœux tant formulés, le fruit de vos innombrables sacrifices. Puisse dieu, le très haut, vous accorder santé, bonheur et longue vie.

- ❖ Mes chère parents Merci pour votre aidée et merci pour votre patience qui me poussée vers la sucées vous être toujours le plus important dans ma vie.
- ❖ A Mes Chères Grands Parents
- ❖ Je donne mes salutations à la famille et surtout à mes frères : Nadia, Nadjat, khadija Chourouk en particulier Younes et AbdBasat et MaryamBatol
- ❖ À tout membre de ma famille c'est un moment de plaisir de dédier cet œuvre.
- ❖ A toutes mes coupines : **Ahlem, Saliha** et **Sarra**, pour les bons souvenirs et le beau temps que nous avons passé ensemble, en leur souhaitant le succès et le bonheur dans leurs vie.

## Table des matière:

Remerciements.....	
Dédicace.....	
Liste des abréviations.....	
Liste des figures.....	
Liste des tableaux .....	
Résumé.....	
Introduction.....	01

## Partie 1 : Etude bibliographique

<b>Chapitre I :Aperçu bibliographique sur le sol</b>	
1. Définition du sol.....	02
2. Caractéristiques générales des phases de sol .....	02
2.1. La phase solide de sol.....	02
✓ fraction minérale.....	02
✓ fraction organique.....	02
2.2. La phase liquide de sol.....	03
2.3 la phase gazeuse de sol.....	03
3. les facteurs influençant l'activité des microorganismes du sol.....	04
3.1 les facteurs physiques.....	04
3.1.1. La texture du sol.....	04
3.1.2. La structure de sol.....	05
3.2. Les facteurs climatiques .....	05
3.2.1. L'humidité du sol.....	05
3.2.1. La température de sol .....	06
3.2.3. Influence des saisons .....	06
3.3. Les facteurs chimiques .....	06
3.3.1 Réaction du sol au PH .....	06
3.3.2. La salinité du sol .....	06
4. Microflore de sol .....	07

4.1 Bactéries .....	07
4.2 Actinomycètes.....	07
4.3 Champignons .....	07
4.4. Les algues .....	08
<b>Chapitre II : Les enzymes des microorganismes</b>	
1. Généralité les enzymes .....	09
2. Les microorganismes et les enzymes produits.....	09
3. Les Actinomycète.....	09
3.2 .Caractéristique des actinomycètes.....	10
3.2.1 Morphologie .....	10
3.2.2. Physiologie .....	10
3.2.3. Caractères chimiques .....	10
3.2.3.1. La paroi cellulaire .....	10
3.2.3.2. La structure de l'ADN.....	10
3.3. Ecologie .....	11
3.4 Taxonomie et critères de classification .....	12
3.4.1. Taxonomie des actinomycètes .....	12
3.4.2. Classification des actinomycètes.....	12
✓ Morphologiques .....	12
✓ Chimio-taxonomiques .....	12
✓ Physiologiques .....	12
✓ Moléculaire .....	13
3.5. Mode de reproduction .....	13
3.5.1. Germination des spores .....	13
3.5.2. Mycélium primaire .....	13
3.5.3. Mycélium secondaire .....	14
3.5.4. Spores .....	14
3.6. Les enzymes produits par les actinomycètes .....	14
3.6.1. Cellulases .....	14
3.6.2. protéases .....	15

3.6.3. Kératinases .....	15
3.6.4. Amylases .....	16
3.6.5. Xylanases .....	16
3.6.6. Lipases .....	16
3.6.7. Chitinases.....	16
3.6.8. Pectinases .....	17
3.6.9. L-asparaginase.....	17
<b>Chapitre III : Matériel et Méthodes</b>	
V. Matériel et méthodes .....	18
1. Objectif.....	18
2. Protocole expérimental général.....	18
3. Prélèvements des échantillons .....	19
4. Isolement des actinomycètes (streptomycète).....	20
4.1. Prétraitement des échantillons .....	20
4.2. Milieux d'isolement.....	20
4.3 Préparation des dilutions .....	20
5. Purification et conservation des isolats.....	20
6. Caractérisation et identification des actinobactéries.....	21
6.1. Caractérisations macroscopiques.....	21
6.2. Caractérisation microscopique.....	21
7. Caractérisation physiologique.....	21
7.1. Hydrolyse de l'amidon.....	21
7.2. Recherche d'une caséinase.....	22
7.3. Recherche d'une uréase (urée hydrolase).....	22
8. Caractérisation biochimique.....	22
8.1. L'utilisation de citrate.....	22
8.2. Les réactions VP et RM.....	22
8.3. La réduction de nitrate réductase.....	22
8.4. La production d'H <sub>2</sub> S.....	23
8.5. La catalase.....	23
8.6. Hydrolyse de la gélatine.....	23
9. L'activité enzymatique.....	23

9.1. Préparation d'inoculum.....	24
9.2. La fermentation submergée.....	24
9.3. Extraction l'extraction brute des amylases.....	24
9.4. Dosage colorimétrique des extraits enzymatiques par la méthode de Biuret.....	25
9.5. Étude cinétique des extraits enzymatiques.....	25
9.5.1. Préparation de la gamme d'étalonnage du glucose.....	25
9.5.2. La cinétique des extraits enzymatiques.....	26
10.2.2. La cinétique des extraits enzymatiques.....	26
10.2. Dosage colorimétrique de l'activité amylasique.....	26
<b>Chapitre IV : Résultats et Discussion</b>	
IV. Résultats et discussion.....	28
1.Étude morphologique des actinomycètes.....	28
1.1.Aspect macroscopique.....	28
1.2.Aspect microscopique.....	28
2. Tests physiologiques et biochimiques.....	30
2.1. Hydrolyse l'amidon.....	30
2.2 Hydrolyse de la caséine.....	30
2.3. Dégradation de l'urée.....	31
2.4. Hydrolyse de la gélatine.....	32
2.5. Réduction des nitrates.....	32
2.6. L'utilisation de citrate.....	33
2.7. recherche de catalase .....	34
2.8. Production d'H <sub>2</sub> S.....	34
2.9. Les réactions de VP et RM.....	34
3. Production des extraits enzymatique des isolats Streptomycètes sp.....	35
3.1. Dosage des extraits enzymatiques par la réaction de Biuret.....	35
3.2. Cinétique des extraits d'amylasiques des isolats Streptomycètes sp.....	37
4.3. Mesure des paramètres cinétiques.....	38

## Liste abréviation

ADN : Acide désoxyribonucléique

GC : Guanine et cytosine

VP : Vosges – prokauer

RM : rouge de Méthylène

TSI : Triple sugar Iron.

$V_i$  : Vitesse initiale d'oxydation

$V_{max}$  : Vitesse Maximale d'oxydation

$K_m$  : Constante de Michaelis

DO : Densité optique



## Liste des figures

<b>Fig 1</b>	Triangle des textures minérales .....	04
<b>Fig 2</b>	coupe de sol montrant la structure .....	05
<b>Fig 3</b>	Mode d'action de l'alpha-amylase.....	13
<b>Fig 4</b>	Protocole expérimental générale .....	18
<b>Fig 5</b>	Les prélèvements des échantillons de sol de la région de la wilaya de la région de Mostaganem.....	19
<b>Fig 6</b>	Protocole expérimental de l'extraction des extraits enzymatiques .....	24
<b>Fig 7</b>	Observations macroscopiques des colonies d'actinobactéries à l'aide d'une l'œil nu.....	28
<b>Fig 8</b>	Observation microscopique des mycéliums de <i>Streptomyces sp</i> à coloration de Gram (G x100).....	29
<b>Fig 9</b>	Test positif d'hydrolyse de l'amidon en présence des isolats de <i>Streptomyces sp</i> ....	30
<b>Fig 10</b>	Test d'Hydrolyse de la caséine est positif pour les isolats de <i>Streptomyces sp</i> .....	31
<b>Fig 11</b>	Test positif de dégradation de l'urée en présence des isolats de <i>Stréptomyces sp</i> ...	31
<b>Fig 12</b>	Test positif d'hydrolyse de la gélatine en présence des <i>Streptomyces sp</i> . .....	32
<b>Fig 13</b>	Tests réduction des nitrites positif en présence S1 et S2 et négatif avec les souches S3.....	33
<b>Fig 14</b>	Test négatif d'utilisation de citrate en présence des isolats de <i>Streptomyces sp</i> ....	34
<b>Fig 15</b>	Test de catalase des trois isolats de <i>Streptomyces sp</i> .....	34
<b>Fig 16</b>	Tests positifs de production d'H <sub>2</sub> S avec les trois souches <i>Stréptomyces sp</i> .....	35
<b>Fig 17</b>	Tests de VP et RM positifs pour les isolats de <i>Stréptomyces sp</i> .....	36
<b>Fig 18</b>	Courbe de la gamme d'étalonnage de la protéine ovalbumine. ....	36
<b>Fig 19</b>	Les concertations des extraits protéiques des trois isolats <i>Streptomyces sp</i> .....	37
<b>Fig 20</b>	Courbe de la gamme d'étalonnage du sucre réducteur pur le glucose .....	38
<b>Fig 21</b>	Les quantités du glucose libéré après hydrolyse d'amidon obtenus en présence des Extraits enzymatiques de <i>Streptomyces sp</i> .....	39
<b>Fig 22</b>	Cinétique enzymatique des extraits d'amylases en fonction du temps.....	39

## Liste des tableaux

<b>Tab 1</b>	Distribution des microorganismes en de leurs variations.....	03
<b>Tab 2</b>	Coefficient de chargaff des différents genres d'actinomycètes.....	11
<b>Tab 3</b>	Répartition des Actinomycètes dans la nature.....	12
<b>Tab 4</b>	Enzymes commercialement importantes produites par les actinomycètes.....	15
<b>Tab 5</b>	Caractérisations macroscopiques des isolats d'actinobactéries.....	29
<b>Tab 6</b>	Les paramètres cinétiques des extraits d'enzymes des isolats de <i>Streptomyces sp</i>	39

### **Introduction**

Les microorganismes sont présents dans l'environnement (le sol, l'air et les eaux). Ces microorganismes occupent une place importante dans notre vie, ils sont actuellement à l'origine des exploitations biotechnologiques (**Smaoui, 2010**). Parmi ces microorganismes, les actinomycètes sont rencontrés sur tous les substrats naturels. Ils jouent un rôle dans la décomposition des matériaux biologiques et dans le processus d'humification. Leur nombre dans la microflore tellurique dépend de la nature, la profondeur, le pH, l'humidité et l'aération (**Larpent et Sanglier, 1989 In Benaissa, 2016**).

D'après **Goodfellow et O'Donnell (1989)**, et **Messaoudi (2013)**, les actinomycètes sont des bactéries à Gram positif présentant une diversité morphologique marquée à haut coefficient de Chargaff (GC%). Elles restent la source la plus productive pour tous les types de métabolites bioactifs (**Ravikumar et al., 2011**). Elles sont connues pour leurs aptitude à dégrader plusieurs métabolites grâce à leurs produits enzymes tels que : la chitinase , la xylanase (**Alberton et al., 2009**), la pectinase (**Arijit et al., 2013**), la cellulase (**Rathan et Ambili , 2011**), la protéase (**Patke et Dey, 1998 ; Vonothini et al., 2008**), la lipase ( **Zhou et al., 2000**), l'amylase (**Syed et al., 2009**) etc. La bio-spécificité des enzymes et leurs utilisations comme agent de production de métabolites ou outils analytiques, dont les industries pharmaceutique, alimentaire et chimique sont les principaux utilisateurs de cette enzyme ont fait l'objet de plusieurs études (**Cuveillier, 1999 ; Pandey et al., 2000**).In **Saci Amina, (2011)**. Vu l'importance de ces enzymes, dans le présent travail, nous avons essayé d'étudier la capacité de quelques souches d'actinomycètes à produire les enzymes amylases, en particulier chez le genre *Streptomyces sp.* Afin, d'atteindre notre objectif, nous avons suivi la démarche suivante.

- Isollements des actinomycètes à partir des échantillons du sol de la région de la Mostaganem.
- Criblage du pouvoir antimicrobien des souches isolées.
- Identification des isolats sélectionnés sur la base des critères morphologiques, physiologiques et biochimiques.
- L'extraction des extraits d'amylases et la mise en évidence de leurs activités catalytiques.
- Les résultats obtenus sont présentés et discutés avec certains travaux qui ont été réalisé.

**I. Aperçu bibliographique sur le sol****1. Définition le sol**

Les sols constituent l'élément essentiel des biotopes continentaux. Les cinq principaux facteurs impliqués dans la formation du sol sont la roche mère, le climat, la topographie, l'activité biologique et le temps (Jenkinson et Powlison, 1976). Le sol a de nombreuses fonctions, c'est un milieu biologique dans et sur lequel se développent des organismes vivants. Ce développement dépend de la qualité de ce sol ou fertilité (quantité de *carbone*, *d'azote*, capacité d'échange *ionique*, etc.). Toutefois, le sol joue un rôle principal dans tous les cycles biogéochimiques (Quénéa K, 2004)

**2. Caractéristiques générales des phases du sol**

Le sol est constitué de trois phases : solide, liquide et gazeuse. Leurs proportions sont variables en fonction, notamment, de leur état hydrique et des contraintes mécaniques qu'ils subissent.

**2.1. La phase solide du sol**

Elle est constituée par des minéraux et des matières organiques en proportions variables. On pourrait considérer les organismes vivants du sol comme une partie de la phase solide, puisqu'ils ne sont ni gazeux ni liquides. D'après (Atlas R.M et al 1992) on distingue deux fractions dans le sol:

**2.1.1 Fraction minérale :** La composition minérale dépend de la nature de la roche-mère, elle constitue en général 95 à 99% du sol. La nature des minéraux peut être extrêmement diverse avec des tailles granulométriques (Quénéa K, 2004). La texture d'un sol correspond à la répartition des minéraux par catégorie de grosseur, indépendamment de la nature et de la composition de ces minéraux. Les sols sont classés suivant leurs proportions relatives en particules argileuses, limoneuses et sableuses (Atlas R.M et al 1992)

**2.1.2 Fraction organique :** La fraction organique d'un sol est constituée à plus de 80% de matière organique morte (résidus de plantes et d'animaux en état de décomposition naturelle) (Paul E et Clark, 1996). On trouve aussi des organismes vivants tels que les bactéries dont beaucoup d'*actinomycètes*, des *champignons* et une microfaune formée de protozoaires, nématodes, insectes, vers de terre (tableau 2) (Quénéa K, 2004). Le sol est un habitat favorable à la prolifération des microorganismes dont leur nombre est supérieur à celui trouvé dans les eaux douces ou marines. La population microbienne s'élève à des valeurs comprises entre  $10^6$  et  $10^9$

bactéries par gramme de sol (Paul E et Clark ,1996). Leur abondance et leur nature dépendent du type de sol, de la végétation, du climat et des diverses actions anthropiques et de leurs variations (tableau 2) (Jenkinson et Powlison, 1976)

**Tableau 1 :** Distribution des microorganismes en fonction du sol (Alexander M ,1994).

Profondeur (cm)	Organismes/g de sol $\times 10^3$				
	Bactéries aérobies	Bactéries anaérobies	Actinomycètes	champignons	Algues
3-8	7800	1950	2080	119	25
20-25	1800	379	245	50	5
35-40	472	98	49	14	0,5
65-75	10	1	5	6	0,1
135-145	1	0,4	-	3	-

## 2.2.La phase liquide du sol

La phase liquide du sol n'est pas de l'eau pure mais une solution dont la composition est complexe et très variable désigné par l'expression « solution du sol ». Elle contient de très nombreuses substances dissoutes organiques et inorganiques, ionisées et non. En générale, la solution du sol est difficile à décrire et à étudier en raison de sa très grande variabilité. Cependant, on peut distinguer deux catégories de solutés :

- Les micro-éléments : La concentration est inférieure à 1 mmol/m<sup>3</sup>, beaucoup d'éléments de traces métalliques entrent dans cette catégorie.
- Les macro-éléments : La concentration est supérieure à cette limite; les éléments les plus fréquents et les composés chimiques correspondants aux: C( HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> ), N (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>), Na ( Na<sup>+</sup>), Mg ( Mg<sup>2+</sup>), Si (Si (OH)<sub>4</sub>), S ( SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>), Cl ( Cl<sup>-</sup> ), K (K<sup>+</sup>), Ca (Ca<sup>2+</sup>) et O<sub>2</sub>. La solution du sol est principalement une solution d'électrolytes, peu concentrée de l'ordre de 10<sup>-3</sup> à 10<sup>-5</sup> mol/L. Elle contient également des ions H<sup>+</sup> et OH<sup>-</sup> dont les concentrations déterminent la réaction du sol caractérisée par le pH (Calvet R ,2000).

## 2.3. La phase gazeuse du sol

La phase gazeuse du sol est souvent appelée l'atmosphère du sol. Sa composition est souvent voisine de celle de l'air. Elle dépend principalement de deux facteurs, la proximité de l'atmosphère, c'est-à-dire la profondeur dans le sol et l'activité biologique.

L'air du sol contient en général les mêmes substances que l'air atmosphérique mais sa composition peut être très différente à cause de l'activité biologique (Soulas G et al ,1983). Les sols bien aérés contiennent environ 180 à 205ml d'O<sub>2</sub> par litre d'air. Cette teneur peut être abaissée à 100 ml ou moins dans les sols inondés et dans des microenvironnements alentours des racines des plantes. La teneur en CO<sub>2</sub> est généralement comprise entre 3 et 30 ml par litre de sol et peut atteindre 100 ml par litre d'air en profondeur ou au voisinage des racines et en milieux saturés en eau. L'air du sol contient également d'autres substances, telles que NO, N<sub>2</sub>O, NH<sub>3</sub>, CH<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>S et parfois, des composés organiques volatils (Calvet R ,2000).

### 3. Les facteurs influençant l'activité des microorganismes du sol

#### 3.1. Les facteurs physiques

##### 3.1.1. La texture du sol

La texture du sol intervient de deux façons : directe par l'action de différentes fractions minérales ou indirecte par son rôle majeur dans la genèse de la structure du sol. Dans un sol sableux suffisamment humide, la continuité du film liquide autour des particules assure une propagation rapide de l'activité microbienne. Cette propagation est ralentie par la présence d'argile. L'action directe des particules argileuses tient en premier lieu à leur effet protecteur des substances organiques par formation de complexes organon-minéraux moins accessibles à l'activité microbienne (Morel ,1989). La texture d'un sol se définit par les proportions relatives des constituants triés selon leur taille (Fig. 1) (Gobat J. Met al 1998)

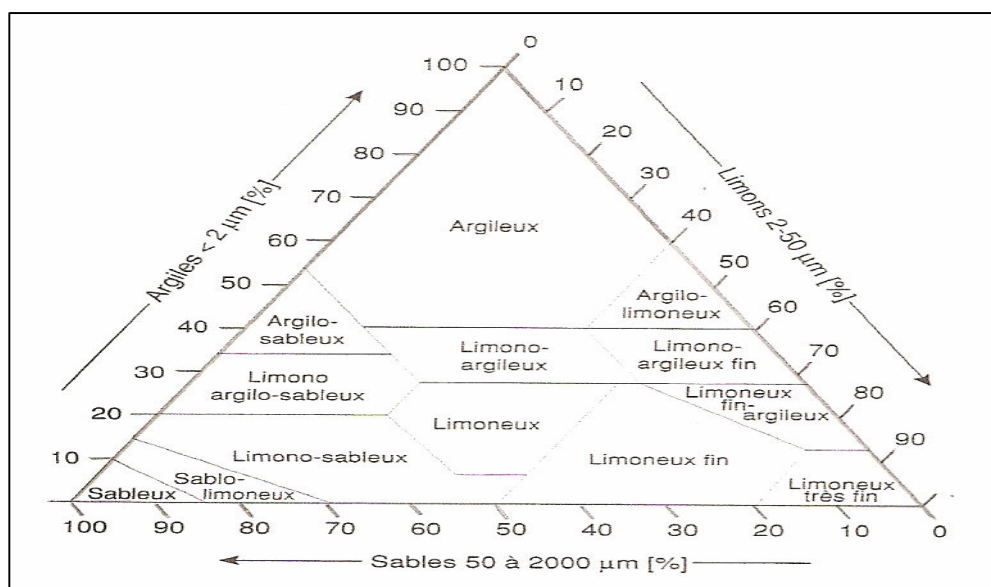
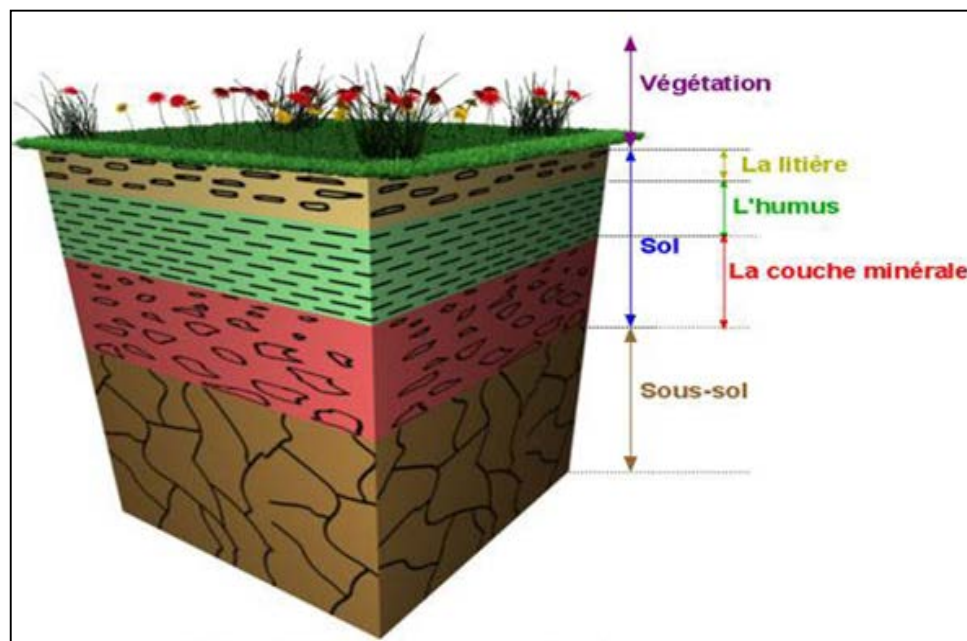


Fig 1: Triangle des textures minérales (Morel ,1989).

### 3.1.2. La structure du sol

Les particules du sol maintenues ensemble par des forces physiques et chimiques forment des agrégats ( **Pierynski G et al ,2005**). L'absence ou la présence ainsi que la forme de ces agrégats définissent le type de structure ( **Gobat J. Met al 1998** ) ( **fig 2**). Ainsi que, la qualité structurale du sol est fortement influencée par la valeur du pouvoir d'oxydoréduction de ce sol. Ce pouvoir oriente la nature et l'intensité de la population microbienne. De la formation et la rupture des agrégats résultent deux actions possibles opposées qui ont comme conséquences. L'inclusion des substances organiques à l'intérieur d'un agrégat et le rend temporairement inaccessible aux microorganismes. La rupture des agrégats par broyage stimule la minéralisation ( **Morel, 1989**).



**Fig 2:** Coupe de sol montrant la structure ( **Morel, 1989**).

## 3.2. Les facteurs climatiques

### 3.2.1. L'humidité du sol

Les sols secs ne présentent qu'une activité microbienne faible, mais lorsque l'humidité augmente l'activité de microorganismes augmente progressivement jusqu' à un maximum puis décroît ( **Morel, 1989**). Selon **Sltener D, 2005**, l'excès d'eau entraîne une aération déficiente et détermine une sélection des germes. Un manque chronique d'eau entraîne également une sélection, mais la microflore inhibée est évidemment différente de la précédente ( **Morel, 1989**). Les alternances de dessiccation et d'humectation stimulent l'activité des microorganismes ( ). L'humidité est nécessaire à la vie des microorganismes et aussi à leurs déplacements. La vie sans air dans le sol est possible puisqu'il existe des êtres anaérobies. Par contre, cette vie exige

la présence de l'eau pour assurer le développement optimum de l'espèce du microbe considéré et varie aussi avec la nature des sols ( **Karabi m ,2010**).

### **3.2.2. La température de sol**

La température du sol représente un facteur écologique très important qui influe la multiplication et la l'activité des microorganismes dans ces régions (**Sasson A ,1967**). Pour chaque activité microbienne existe un seuil de température. Un optimum de température, au-dessous ou au-dessus du seuil correspond respectivement à une activité maxima ou nulle dans laquelle la cellule vivante est détruite (température létale). La plupart des bactéries et des actinomycètes ont un développement optimal entre 25 et 40°C (**Morel,1989**).

### **3.2.3. Influence des saisons**

La succession des saisons exerce un effet très important sur la microflore des sols. L'humidité et la température sont deux facteurs essentiels dont la combinaison oriente l'intensité saisonnière de l'activité microbienne (**Morel,1989** ). Les variations saisonnières de la microflore sont probablement dues en grande partie à des changements en qualité et quantité dans les apports nutritifs que constituent les feuilles et les branches mortes ( **Boullard et Moreau ,1962**).

## **3.3. Les facteurs chimiques**

### **3.3.1. Réaction du sol au pH**

Le degré d'acidité du sol constitue un facteur limitant pour les germes. Généralement, certains genres bactériens tels que les actinomycètes sont très sensibles aux variations du pH, ils favorisent des milieux proches de la neutralité, alors que les champignons préfèrent un pH bas (sol acides) ( **Boullard et Moreau ,1962**).

### **3.3.2. La salinité du sol**

L'évolution de la microflore du sol est influencée par le taux de salinité. L'augmentation des taux fait diminuer le nombre de microorganismes (**Maameri ,M,2007**), l'ensemble des processus biologiques surtout la nitrification et la réduction de la respiration aussi ( **Dellal A et Halitim ,1992**). D'après (**Boullard et Moreau ,1962**), les sols salés constituent pour les micro-organismes telluriques, un milieu défavorable en raison de la présence d'ions toxiques ; du pH parfois très basique ; de la salinité de leur tension osmotique parfois élevée. L'inhibition de l'activité biologique par les sels se traduit par une forte teneur en composés hydrosolubles très mobiles.

## **4. Microflore du sol**

Les micro-organismes du sol, jouent un rôle fondamental dans les processus importants comme la régulation des cycles biogéochimiques (azote, carbone, soufre) ( **Sasson A ,1967**).



**4.1. Bactéries**

Ces bactéries présentent le groupe majeur des microorganismes du sol de points de vue quantitatif et fonctionnel (Morel, 1989). Elles sont classées en bactéries autotrophe, utilisant le carbone sous forme minérale, et les bactéries hétérotrophes en utilisant de carbone sous forme organique. Elles se multiplient dans les milieux aérés riches en azote et peu acides (pH supérieur à 6). Elles sont surtout abondantes autour des rhizosphères racinaires de certaines plantes (graminées, légumineuses) (Duchaufour, 2001). Ces derniers constituent une fraction importante de la matière organique humifère. Elles participent à la formation des micro-agrégats. Dans les cycles biogéochimiques, tels que, la minéralisation de la matière organique, la transformation de certains composants organiques en humine (Gobat et al, 2003).

**4.2. Actinomycètes**

Ce groupe des eubactéries est très ramifié hétérotrophe, il forme un mycélium ramifié plus ou moins différencié très fin, dans le sol. Les germes les plus fréquents *Streptomyces* et *Nocardia*. Ils sont plus sensibles à l'acidité que les moisissures préférant des pH de 6 à 7,5 (Soltner D, 2005) L'ensemble des actinomycètes jouent un grand rôle important dans le sol. Ils sont aptes à dégrader les substances organiques difficilement décomposables et produisent des vitamines et des antibiotiques. Toutefois, ils présentent un indicateur d'un sol de bonne structure et aération. Ils participent dans la décomposer les composés aromatiques de la matière organique fraîche (lignine, certains tannins) (Duchaufour, 2001).

**4.3. Champignons**

Les champignons du sol ou mycètes sont des levures, des champignons supérieurs et surtout des moisissures des genres *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium* etc. à la différence des bactéries, ils sont toujours hétérotrophes et aérobies. Ils présentent des dimensions diverses et ils résistent mieux que les bactéries à la sécheresse et à l'acidité (Soltner D, 2005). Leur rôle est important dans la dégradation de substances résistantes comme la lignine. Les champignons peuvent établir une vie de symbiose avec les racines et très bénéfiques pour les végétaux (Morel, 1989).

**4.4. Les algues**

Ce sont des organismes autotrophes, unicellulaire (colonies filamenteuses) et souvent abondantes dans le sol (Soltner D, 2005). Elles sont localisées à la surface ou dans les larges fissures (Gobat et al 2003).

Grâce à leur activité photosynthétique, les algues colonisent rapidement les surfaces minérales brutes et accélèrent leur altération par des substances dissolvantes. Les algues participent aussi à la cohésion des particules solides à travers la production des polysaccharides

extracellulaires (**Soltner D, 2005**). Elles protègent les environnements arides ou désertiques contre l'érosion en formant des croûtes à la surface du sol (**Dommergues et Manganot, 1970**).

**II. Les enzymes des microorganismes (les actinomycètes)****1. Généralités les enzymes**

Les enzymes sont des polypeptides de masses moléculaires élevées (10 à 1 000 kDa) dans lequel sont arrangés les acides aminés. Elles sont constituées de plusieurs acides de la série L- $\alpha$ -aminés, unis entre eux par une liaison formée par condensation entre le groupement carboxyle d'un acide aminé et le groupement amine d'un autre acide aminé afin de former une liaison amide.

**2. Les microorganismes et les enzymes produits**

Les micro-organismes qui vivent dans le sol ne peuvent pas transporter de molécules complexes à l'intérieur de leur cytoplasme. Les enzymes extracellulaires des micro-organismes sont des bio-catalyseurs de grande importance et sont applications industrielles telles que le textile, les bioraffineries, l'alimentation, les pâtes et papiers, l'agriculture, les détergents et les produits pharmaceutiques. Environ **23 000** métabolites secondaires bio-actifs produits par les micro-organismes, il y a presque **10 000** de ses métabolites qui sont produits par les *actinomycètes*. Parmi les *actinomycètes*, les espèces *Streptomyces* produits environ **7600** de ses composés bioactifs ( **Berdy et anbiot ,2005**). D'après ( **Saadoum et al ,2007 et Sathya et Ushadevi ,2014**) ; les *actinomycètes* sont d'une importance énorme, car, ils possèdent la capacité de produire et de sécréter une variété d'enzymes hydrolytiques extracellulaires.

**3. Les actinomycetes****3.1. Définition**

Les *actinomycètes* sont des bactéries dont la croissance donne lieu a des colonies rond (**Eunice et Prosser,1983**) constituées d'hyphes, c'est-à-dire des filaments qui irradient par croissance centrifuge tout autour du germe qui leur a donné naissance ( **Gttlibe D ,1973 et Lechevalier ; Lechevalier,1981 et Eunice ; Prosser,1983**). Cela explique leur dénomination « *actinomycètes* » du grec *akitino*, et *mycetes* « *champignons* » ou *champignons* rayonnant (**Gttlibe D ,1973** ). Les *actinomycètes* se situent dans l'ordre des *actinomycetales* c'est un groupe de bactérie à coloration de Gram positive et la plupart sont abondamment distribuées dans la nature ( **Mariat et Sebald ,1990**). Ils ont souvent été confondus avec les *champignons* du fait de leur morphologie fongöide filament ramifiés, organe de sporulation etc.

**3.2. Caractéristique des *actinomycètes*****3.2.1. Morphologie**

La morphologie des *actinomycètes* varie de simple bacillediphtéroïde à des formes mycéliennes complexes. Certains peuvent présenter un mycélium qui se développe sur et dans les milieux (Gttlibe D ,1973 ). Le mycélium végétatifs, ou de substrat est constitué par des hyphes, qui pénètrent dans le milieu ou se propagent à sa surface ( Mchelen et Castillo,1984).

Cette formation donne aux des *actinomycètes* la capacité à dégrader la matière organique insoluble grâce à leurs enzymes extracellulaires ( Locci R ,1976)

**3.2.2. Physiologie**

Généralement, les *actinomycètes* sont des bactéries à coloration de Gram positive (Locci R ,1976 et Williams et al, 1993 et Sanglier et Trujillo, 1997), aérobies à métabolisme oxydatif, plus rarement anaérobies à métabolisme fermentatif. Ces plusieurs espèces sont hétérotrophes, toutefois, il existe certains organismes aussi qui sont de croissance chimio-autotrophique La plupart ont des exigences nutritionnelles telles que les vitamines et certains acides aminés. Ils colonisent fréquemment les substrats insolubles tel que le charbon et peuvent dégrader les protéines, la cellulose et d'autres matières organiques comme la paraffine et les résidus des plantes dans le sol ( Crawford et al ,1993 et Lacey J ,1997).

**3.2.3. Caractères chimiques****3.2.3.1. La paroi cellulaire**

Leur paroi cellulaire ne contient pas la chitine ni la cellulose, mais une glycoprotéine présentant la lysine (formes fermentatives) ou de l'acide diaminopimélique (formes oxydatives). Leur cytologie est celle des bactéries, les *actinomycètes* n'ont pas de membrane nucléaire, elles possèdent des organites flagellaires ressemblant à ceux des bactéries. Elles sont pour la plupart, sensibles au lysozyme et aux agents antibactériens ; le diamètre de leur hyphes est plus petit que celui des champignons (Gttlibe D ,1973 et Mariat et Sebald ,1990).

**3.2.3.2. La structure de l'ADN**

La composition le chromosome nucléaire permet de définir les familles d'*actinomycètes*, pour cela on étudie le coefficient de Chargaff ou GC% qui présente le nombre de paires de bases guanine cytosine pour 100 paires de bases dans l'ADN (Larpent et sanglier 1989) . Les *actinomycètes* dont le coefficient de Chargaff (G+C %) est généralement compris entre 63 et 76% (tab. 1) (Ensign J .C ,1978 et Larpent et sanglier 1989 ).

**Tableau 2 :** Coefficient de Chargaff des différents genres d'*actinomycètes* (Larpen et Sanglier, 1989).

Genres	G+C %
<i>Mycobacterium</i>	64-70
<i>Actinomyces</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

### 3.3. Écologie

Les *actinomycètes* représentent un groupe largement distribué dans les écosystèmes naturels (tableau 3) (Srinivasan et al ,1991). Les *actinomycètes* sont abondants dans le sol terrestre et sont surtout présents dans la couche comprise entre la surface du sol et jusqu'à 2 m de profondeur dans la rhizosphère ( Nonomura et Ohara ,1969) Ces bactéries sont aussi abondantes en milieu hydrique, dans les eaux des lacs, des rivières, les ruisseaux et également les mers et les océans ( Cheraiti et Gacemi Kirane ,2012). Les *actinomycètes* ont été également isolés à partir de nombreux environnements aquatiques : eau de mer et de sédiments marins ( Jensen et al ,1991 et , Ghanem et al ,2000), eau douce ( Kitouni M et al ,2005), eau issue de marécages salés ( Al-zarban et al 2002 et Boughachiche tet al ,2005). L'air constitue pour les *actinomycètes* un moyen de transport et non pas un habitat ( Gazenko et al ,1998). Certaines genres d'*actinomycètes* préférer certains habitats par rapport à d'autres, comme *Thermoactinomyces* qui se trouve fréquemment dans les composts ( Song et al ,2001).

**Tableau 3:** Répartition des *Actinomycètes* dans la nature ( **Goodfellow et Williams ,1983**)

Genres	Habitats
<i>Actinomadura</i>	Sol
<i>Actinoplanes</i>	Sol, eau, litière.
<i>Frankia</i>	< Nodule des racines
<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>Thermoospora</i>	Matière en décomposition et fermentation

### 3.4. Taxonomie et critères de classification

#### 3.4.1. Taxonomie des actinomycètes

Les *actinomycètes* forment un grand groupe de microorganismes procaryotes appartenant à l'ordre des *Actinomycétales* créée par **Buchanan en 1916**. Actuellement, le phylum Actinobacteria renferme cinq classes tel qu'il est décrit dans le livre **Bergey's manual Acidimicrobiia, Coriobacteriia, Nitrospirae, Rubrobacteriia et Thermoleophilia** qui sont subdivisées en 19 ordres, 50 familles et 221 genres(**Goodfellow et Williams ,1983**) ).

#### 3.4.2. Classification des *actinomycètes*

La taxonomie et l'identification des genres des *actinomycètes* sont basées sur plusieurs critères ; morphologiques, chimiques, physiologiques et moléculaires ( **Smaui S , 2010**)

- **Morphologiques** : le mycélium est fragmenté ou non, présence ou non de mycélium aérien, couleur des mycélia, production des spores, etc.
- **Chimio -taxonomiques** : la composition cellulaire en acides aminées, en sucres et en lipides etc.

Cependant, les critères de l'identification des espèces sont basées sur:

- **Physiologiques** : tolérance au chlorure de sodium, croissance en différentes valeurs de Température et de pH, recherche des enzymes et différents métabolites intermédiaires et Terminaux.

- **Moléculaires** : détermination du (G+C)%, séquençage des gènes de l'ARNr 16S, Hybridation ADN-ADN.

### 3.5. Mode de reproduction

Le cycle biologique est comparable à celui de nombreux *Micromycètes* Eucaryotiques. Les *actinomycétales* possèdent une structure de procaryotes avec un cycle biologique semblable à certains champignons (Fig 3) (Floyd et al ,1987).

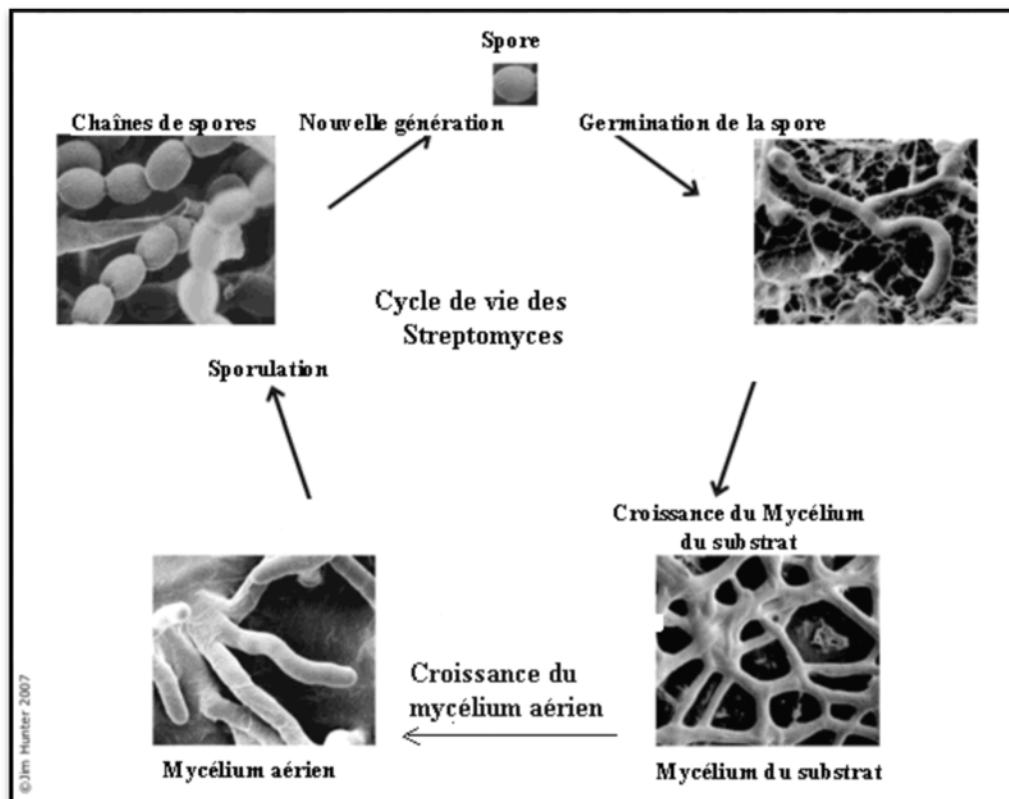


Figure 3 : Cycle de vie des *Streptomyces SP* (floyd et al ,1987)

#### 3.5.1. Germination des spores

Quatre étapes peuvent être distinguées ; l'activation, l'initiation, l'émergence du tube germinatif et sa croissance, pour les quelles le degré hygrométrique joue un rôle important.

#### 3.5.2. Mycélium primaire

Le tube de germination va croître et donner des hyphes qui se ramifient intensément. Ce mycélium se développe sur et dans le substrat. Il est dénommé mycélium primaire, mycélium végétatif ou mycélium de substrat. Eventuellement pigmenté, il forme des parois transversales isolant les zones les plus âgées. Il peut se fragmenter chez les bactéries du genre *Nocardioformes*.

#### 3.5.3. Mycélium secondaire

Sur le mycélium primaire va se développer un mycélium secondaire aérien. Ces hyphes sont peu ramifiées et pourvues d'une enveloppe hydrophobe. Elles sont plus épaisses que les hyphes primaires. Ce mycélium est généralement pigmenté (gris, vert, rouge etc.) sur ce mycélium aérien se forment des spores.

#### **3.5.4. Spores**

La sporulation est contrôlée par des facteurs extérieurs aux microorganismes et par des facteurs propres à ceux-ci. C'est un processus hautement régulé (Cormick et al ,2012) Les hyphes aériens des *actinomycètes* subissent une série de changements qui donneront naissance aux spores. Ces spores sont soit isolées, soit groupées en chaînes ou même enfermées dans un sporangium ou conidies. Ces derniers libèrent des spores isolées ou groupées en chaînes. Elles sont de diverses formes, d'aspect lisse et ridé (Mighélez et al ,2000).

#### **3.6. Les enzymes produits par les actinomycètes**

Les enzymes produites par les *actinomycètes* sont les amylases, les protéases, les lipases, les cellulases, les xylanases, les chitinases, Les pectinases, les kératinases, L-asparaginase. Elles trouvent actuellement plusieurs applications dans différentes industries (tableau 4).

##### **3.6.1. Cellulases**

Les actinomycètes sont l'un des producteurs de cellulase connus [ Bhattacharya et al ,2007 et Horikoshi K ,1999). Les *Streptomyces drozdowiczii*, *S. lividans*, *S. longispororuber*, *S. rutgersensis*, *Streptomyces* sp. sont de meilleurs exemples pour la production de cellulase utilisée dans des industries, telles que, les pâtes et papiers, les textiles, les bioraffineries, les matières premières animales, le vin et le brassage, cuisson ( Jacob et al ,2008 et Gohel et Singh ,2012 )



**Tableau 4 :** Enzymes commercialement importantes produites par les actinomycètes (**Salma et al, 2017**)

Enzyme	Souches	PH optimal et Température	Industriel
			Applications
Cellulase	<i>Streptomyces ruber</i> <i>Thermobifida haltolerans</i>	6 et 37° C 7 et 45° C	détergent, papier et pâte à papier, textile
Protease	<i>Streptomyces pactum</i> <i>Streptomyces thermoviolaceus</i>	7.5 et 40 °C 6.5 et 66° C	Pharmaceutique Cuir, Kératine Détergent, Aliments Brassage
Keratinae	<i>Actinomadura keratinilytica</i>	10 et 70° C	Cuir
Amylase	<i>Streptomyces erumpens</i> <i>Thermobifida fusca</i>	9 et 45° C 6 et 60° C	Détergent, Cuisson Textile, pâte à papier
Xylanase	<i>Streptomyces spp.</i> <i>Actinomadura sp</i>	9 et 50° C 4 et 70° C	Papier et pâte L'alimentation animale, Cuisson
Lipase	<i>Streptomyces exfolie</i> <i>Nocardiopsis alba</i>	6 et 37° C 7 et 30° C	Papier et pâte Détergent Produits de beauté
Chitinae	<i>Streptomyces thermoviolaceus</i> <i>Nocardiopsis prasina</i>	6 et 60 C 7 et 55 C	Textile Cuir
Pectinase	<i>Streptomyces lydicus</i>	60.5 et 45° C	Boisson Textile

### 3.6.2. Protéases

Protéases de *Streptomyces spp.* peut être utilisé dans le traitement de différents agroindustriel déchets comme les plumes, les ongles, les cheveux et les déchets végétaux [ **Bentley et al ,2002**]. Protéases produites par *Nocardiopsis spp.* sont connus comme importants enzymes industrielles et ont le potentiel d'être largement utilisé dans cuirs, pâtisseries, textiles, détergents, brasseries, fromages et épilateurs industrie (**Gohel et Singh ,2012**). La plupart des protéases montrent une tolérance aux divers stress abiotiques comme le pH élevé, la température et la salinité ( **Rathan et Ambili ,2011**)

### 3.6.3. Kératinases

Les kératinases sont des enzymes industriellement importantes produites par un certain nombre de souches d'*Actinomycètes* comme *Streptomyces spp.* et *Actinomadura*

( **Habbeche et al ,2014**)Ces enzymes sont principalement utilisées pour l'hydrolyse de la kératine. Il y a une grande demande pour le développement biotechnologique alternative pour le recyclage des déchets.

#### **3.6.4. Amylases**

Les amylases sont considérées comme un groupe important d'enzymes hydrolysant l'amidon en sirops à teneur élevée en fructose, glucose et maltose, ils peuvent être classés en endoamylases et exoamylases. *Actinomycètes* des souches par **ex.** *Streptomyces erumpens* et *Thermobifidafusca* ont la capacité à sécréter des amylases à l'extérieur des cellules pour effectuer les digestions extracellulaires ( **El-sersy et al ,2010 et Zhang et al ,2011**). Ces enzymes thermostables peuvent être utilisées dans la boulangerie, l'industrie pharmaceutique, du papier et de la pâte. Amylases de *Streptomyces spp.* joue un rôle important dans la biotechnologie appliquée dans les différentes industries et ils présentent environ **25%** de la demande du marché mondial des enzymes.

#### **3.6.5. Xylanases**

Les membres du genre *Streptomyces* sont les principaux producteurs de xylanases parmi les *actinomycètes*. Xylan est la plus dominante composante des hémicelluloses et il est généralement utilisé dans l'amélioration d'industrie de la pâte et du bioblanchiment [52]. Cellulases-libres et thermostables les xylanases sont produites par des genres *actinobactériens*, *Actinomadura* et *Thermoactinomyces* avec une température optimale de 70°C ( **Brzezinski et al ,1999**). Certaines espèces de *Streptomyces* sont capables d'hydrolyser divers résidus comme les déchets de paille et les tourteaux qui entraînent la production de biogaz (**Chakraborty et al ,2012**).

#### **3.6.6. Lipases**

Un certain nombre de souches d'*Actinomycètes* ont la capacité d'hydrolyser les huiles et les graisses. Les lipases et les estérases forment divers groupes hydrolytiques qui catalysent les lipides comme les triglycérides (**Aly MM et al ,2012**). Les *Streptomyces exfolie* et *Nocardiosis alba* produisent des lipases qui hydrolysent les liaisons ester dans les triglycérides et libère le glycérol et les acides gras ( **Gandhimathi et al ,2009**)Les lipases sont utilisées dans le traitement des graisses et huiles, des additifs, des détergents, des produits cosmétiques etc.

#### **3.6.7. Chitinases**

Les chitinases sont produites par des virus, des *bactéries*, les *actinobactéries*, les plantes supérieures et les animaux et jouent d'importants rôles physiologiques et écologiques (**Verma et al ,2007**)

Les chitinases sont un autre groupe d'enzymes importantes sur le plan industriel qui ont la capacité d'hydrolyser la chitine. La Chitinase des souches Actinomycètes a été utilisée pour récupérer le chitibiose, un antioxydant potentiel qui a généralement des applications en biomédical et l'industrie alimentaire (**Bhattacharya et al ,2007**) Chitinases sont thermostables et actifs à une large gamme de pH qui les rendent appropriés pour des applications industrielles (**Kulkarni et Gadre ,2002**). Elles sont utiles dans l'hydrolyse des oligosaccharides de chitine qui ont un potentiel d'utilisation comme antioxydant, agents antimicrobiens, anticancéreux, anticoagulants et antitumoraux (**Horikoshi K ,1999**)

### **3.6.8. Pectinases**

Les pectinases sont produites par plusieurs espèces de *Streptomyces* telles que *S. lydicus* (**Jacob et al ,2008**) Ces enzymes sont utilisées dans l'industrie alimentaire pour l'extraction et clarification des vins, jus, composés aromatisants et industrie textile pour la préparation de tissus de lin et de fabrication de chanvre (**Janaki et al ,2016**) La polygalacturonase est l'une des pectinases les plus importantes largement utilisé dans différentes industries.

### **3.6.8. L-asparaginase**

Les *actinomycètes* sont une excellente ressource pour la production de L-asparaginase (L-asparagine-amino-hydrolase). Une gamme d'*actinomycètes* du sol, *Streptomyces griseus*, *S. karnatakensis*, *S. albidoflavus* et *Nocardia sp.* Ont des capacités à produire de l'enzyme L-asparaginase (**Janaki 2016 et Narayana et al 2007**) Les L-asparaginases microbiennes ont été utilisées comme agent thérapeutique dans la guérison de certains cancers humains, principalement dans la leucémie lymphoblastique aiguë (**Mostafa et Salama ,1979**).

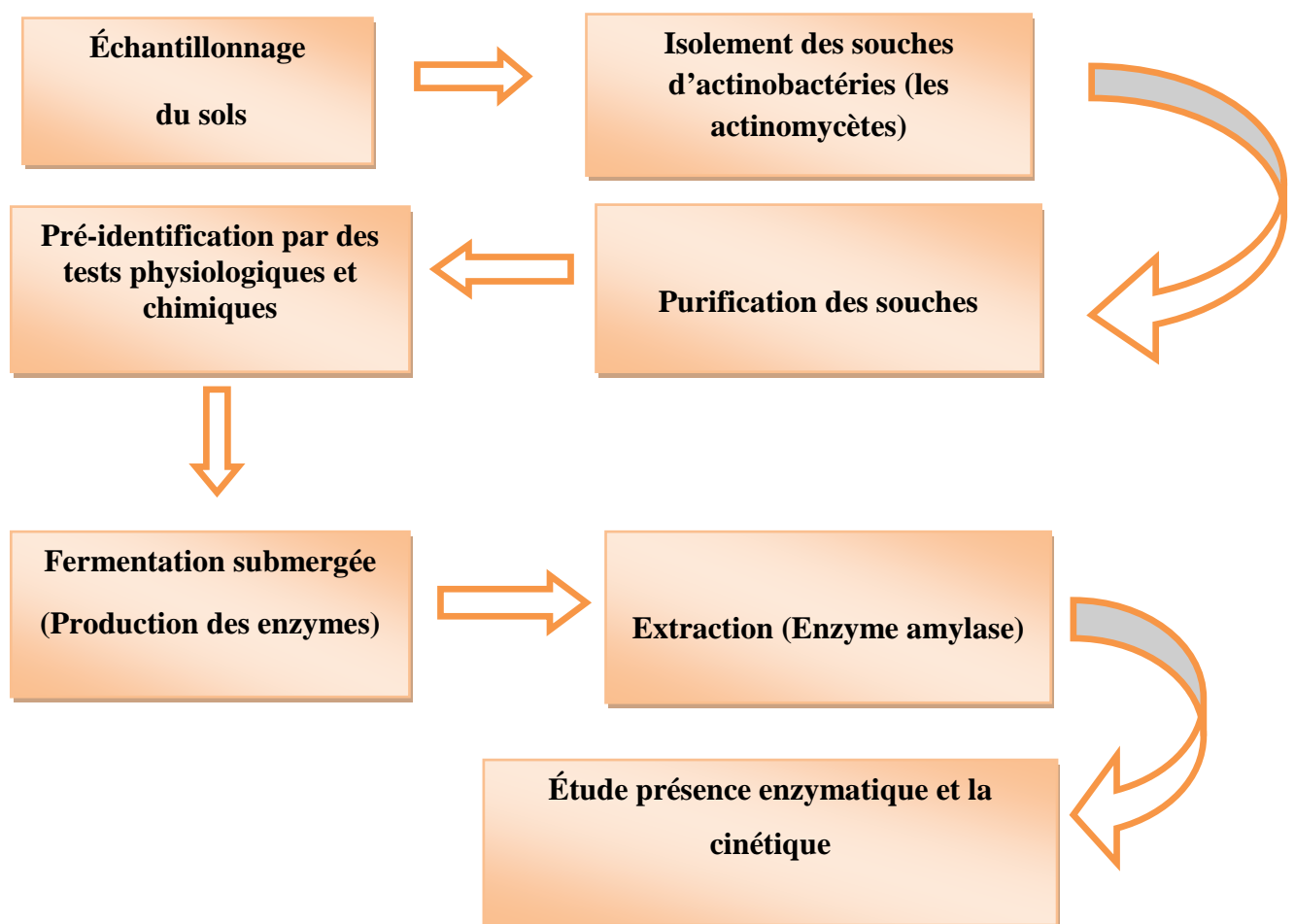
### III : Matériel et méthodes

#### 1. L'objectif global

Le présent travail est focalisé sur l'isolement et l'identification de quelques souches des actinobactéries du genre *Streptomyces sp* d'un sol de la région de Mostaganem. L'objectif principal est de mettre en évidence la variation protéique des enzymes «amylasiques» par des tests biochimiques de dosage colorimétrique.

#### 2. Protocole expérimental général

La figure ci-dessous présente le protocole expérimental général, qui est constitué de plusieurs étapes réalisées durant cette étude (fig. 4).



**Fig. 4:** Protocole expérimental générale.

### 3. Sites de prélèvement des échantillons

Le choix du site des prélèvements des échantillons a porté sur des sols de la région de la wilaya de Mostaganem. Trois échantillons sont prélevés à une profondeur d'environ 25 cm (fig. 5). Les sols ont été placés dans des sacs stériles. Chaque échantillon est prélevé selon la méthode de cinq points aliquotes récupérer sur une surface de 100 m<sup>2</sup>.



**Fig. 5 :** Les prélèvements des échantillons de sol de la région de la wilaya de Mostaganem.

- **A :** Limité du point de prélèvement;
- **B :** Elimination de la terre à 2mm ;
- **C et D :** Sol prélevé a une profondeur d'environ 25 cm



#### 4. Isolement des actinomycètes (*Streptomycètes*)

##### 4.1. Prétraitement des échantillons de sol

Le prétraitement des échantillons permet de réduire la croissance de la flore fongique et bactérienne, afin, d'augmenté le nombre des actinobactéries contenue dans le sol. Cinq échantillons sont prélevés sur une surface d'environ 100 m<sup>2</sup>. Chaque échantillon a été traité par bicarbonate de calcium. Un gramme de chaque sol séché à l'air est mélangé avec 0,1 g de CaCO<sub>3</sub>, puis incubé à 26°C pendant 7 jours dans une étuve (**Cavala, 1994**).

##### 4.2. Les milieux de culture

Les actinobactéries peuvent être isolés sur des milieux de culture liquide ou solides. Parmi ces milieux on a le milieu amidon caséine ajusté à pH 7,0 et Le milieu Bennet (**Küster et Williams, 1964 ; Lee et al., 2011 ; Sharma et al., 2011 in Messaoudi, 2013**) .

La composition de ces milieux est présentée dans l'annexe 1, elle doit être additionnée à des antibiotique soit des antifongiques ou /et des antibactériens Gram- à 10 µg/ml. Leurs emplois dans le milieu d'isolement facilitent l'élimination totale des champignons, la plupart des levures et les bactéries à Gram négatif (**Ouhdouch et al., 2001**).

##### 4.3. Préparation de la suspension de dilution de sol et ensemencements

La préparation des solutions de sol se fait par la méthode de dilutions des suspensions. La suspension mère du sol est préparée par l'addition de 1 gramme de sol, et introduit dans un tube contenant 9 ml d'eau physiologique stérile. Les échantillons sont homogénéisés par agitation au vortex pendant quelques minutes. Les suspensions ainsi obtenues constituent les solutions à analyser. Cette suspension mère sert à réaliser des dilutions décimales (**Agate et Bath, 1963**).

À l'aide d'une pipette pasteur stérile sous forme de râteau, 0,1 ml de chaque dilution (10<sup>-1</sup> à 10<sup>-5</sup>) a été étalée sur la surface d'un milieu gélosé (d'amidon caséine). Les boîtes de Pétri sont incubées à 30°C pendant 7 à 14 jours. Des observations régulières sont effectuées chaque semaine (**Lemriss et al. 2003**).

#### 5. Purification et conservation des isolats

Les colonies d'actinomycètes obtenues subissent une purification, en réalisant les repiquages successifs nécessaires sur gélose nutritif (annexe D), ensuite, sont incubés pendant une semaine à 30°C. Cette opération est répétée jusqu'à l'obtention des souches pures. Les souches pures doivent être conservée à 4°C (**Lemriss et al., 2003**).

## 6. Caractérisation et identification des actinobactéries

### 6.1. Caractérisations macroscopiques

Cette technique consiste à insérer un fragment de la colonie est ensemencé contre la lamelle en contact du milieu à l'aide d'une anse de platine, la boîte est ensuite incubée à 30°C. Après l'incubation, la lamelle est retirée avec précaution, déposée sur une lame contenant une goutte d'eau distillée puis examinée directement au microscope optique (**G×40**) (**Williams et Cross, 1971**). Les caractéristiques macroscopiques sont basées sur la taille, la forme, la texture, la couleur, la répartition des spores, l'observation du mycélium aérien et les pigmentations diffusibles sur les milieux de culture. (**Benouagueni, 2014**).

### 6.2. Caractérisation microscopique

Les caractéristiques microscopiques ont été réalisées par la méthode de coloration de Gram. Les principales étapes de cette technique sont les suivantes :

1. Des frottis sont réalisés à partir des colonies des actinobactéries bien isolés à l'aide d'une anse de platine dans des conditions aseptiques ;
2. Les bactéries sont émulsionnées dans une gouttelette d'eau distillée stérile ;
3. Les frottis sont fixés par une flamme à l'aide d'un bec bunsen;
4. Quelques gouttes de violet de gentiane sont déposées sur la lame pendant 1 minute, puis rinçage par eau distillé ;
5. Couvrir la lame avec la solution de Lugol pendant 1 minute ;
6. Le frottis est décoloré avec de l'alcool pendant 10 secondes, puis rincer à l'eau distillée. Quelques gouttes de la safranine sont déposées sur lame pendant 45 secondes ;
7. Après lavage à l'eau, le frottis a été séché avec du papier absorbant ;
8. Observation au microscope optique du faible grossissement 10 jusqu'au fort (G100 x).

Selon **Bergey's (2009)**, les caractéristiques morphologiques des souches ont été comparées avec ceux déterminées dans les guides pratiques de l'identification morphologique des actinomycètes le «*Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 2009*» et le «*Bergey Manual of Systematic Bacteriology, 2012*».

## 7. Caractérisation physiologique

### 7.1. Hydrolyse de l'amidon

Selon la méthode de **Williams et Cross (1971)**, ce test a été réalisé sur un milieu gélosé à base d'amidon (**Annexe 1**). Après 7 jours d'incubation à 30°C, la gélose a été recouverte d'une solution de Lugol. La lecture a été faite après 30 minutes et poursuivie jusqu'aux 14 jours d'incubation. L'hydrolyse est mise en évidence par la présence d'une zone claire autour des colonies après ajout du Lugol.

## 7.2. Recherche d'une caséinase

L'hydrolyse de la caséine a été étudiée sur un milieu gélosé contenant 05 % de lait écrémé (**Annexe 1**). L'ensemencement de la souche à tester est réalisé par des stries et l'incubation a été effectuée à 30°C. Après 7 jours, l'apparition d'une auréole claire autour des colonies indique la dégradation de la caséine (**Raval et al., 2012 ; Roy et al., 2014**).

## 7.3. Recherche d'une uréase (urée hydrolase)

La recherche de l'uréase a été effectuée sur milieu contenant du rouge de phénol (**annexe 1**). Les tubes ont été ensemencés par une culture d'actinomycètes à tester à l'aide d'une anse de platine puis agité et incubé à 30°C. Après, 7 jours si la souche possède une uréase, la production de NH<sub>3</sub> fait virer l'indicateur utilisé vers la couleur rouge violacé, traduisant un résultat positif.

## 8. Caractérisation biochimique

Il existe plusieurs tests biochimiques pour effectuer une près identification, tels que l'utilisation de citrate, la production d'H<sub>2</sub>S, la catalase, l'hydrolyse de la gélatine, les tests des réactions VP et RM (les acides mixtes par la réaction de rouge méthyle ; fermentation de butylène glycolique par la réaction de Voges- Prauskaouer) et la réduction de nitrate.

### 8.1. L'utilisation de citrate

Le milieu utilisé est le citrate pour déterminer la capacité de la souche à utiliser le citrate comme une seule source de carbone. L'ensemencement des actinobactéries sur un milieu incliné par des stries longitudinales au moyen d'une anse et suivi d'une incubation à 30°C pendant 7jours. Le virage de la couleur du vert en bleu du milieu, traduit l'utilisation du citrate par les souches

### 8.2. Les réactions VP et RM

Sur un milieu liquide Clark et Lubs (annexe 1), une colonie de la souche à étudier est ensemencée puis incubé à 30°C pendant 7jours. Après l'incubation, on divise le milieu dans deux tubes stériles et on ajoute quelques gouttes de **VP I** dans l'un des deux tubes et quelques gouttes de **VP II** dans l'autre tube. Après, quelques gouttes de réactif rouge de méthyle sont additionnées dans un seul tube. S'il y a le virage en rouge, le test est positif.

### 8.3. La réduction de nitrate

La production de nitrate réductase est réalisée sur un milieu liquide nitraté ensemencer par des actinobactéries, puis incubée à 30°C durant 5 à 7 jours. La lecture se fait en ajoutant trois gouttes des réactifs de Griess **I** et **II**. La réduction de nitrates en nitrites est mise en évidence par l'apparition d'une coloration rouge. En absence de cette coloration, on ajoute la poudre de zinc



- La présence de la coloration rouge indique présence de nitrate dans le milieu donc le test est négatif (la souche n'a pas produit l'enzyme réductase nitrite).
- En absence de la coloration, le test est positif (le stade nitrite a été dépassé donc les bactéries possédant un nitrate réductase très active).

#### **8.4. La production d'H<sub>2</sub>S**

Des tubes contenant du milieu **TSI** (annexe1) sont ensemencés par les bactéries actinomycètes, puis incubés pendant 14 jours à 30°C. La production de l'H<sub>2</sub>S se manifeste par un noircissement du culot.

#### **8.5. La catalase**

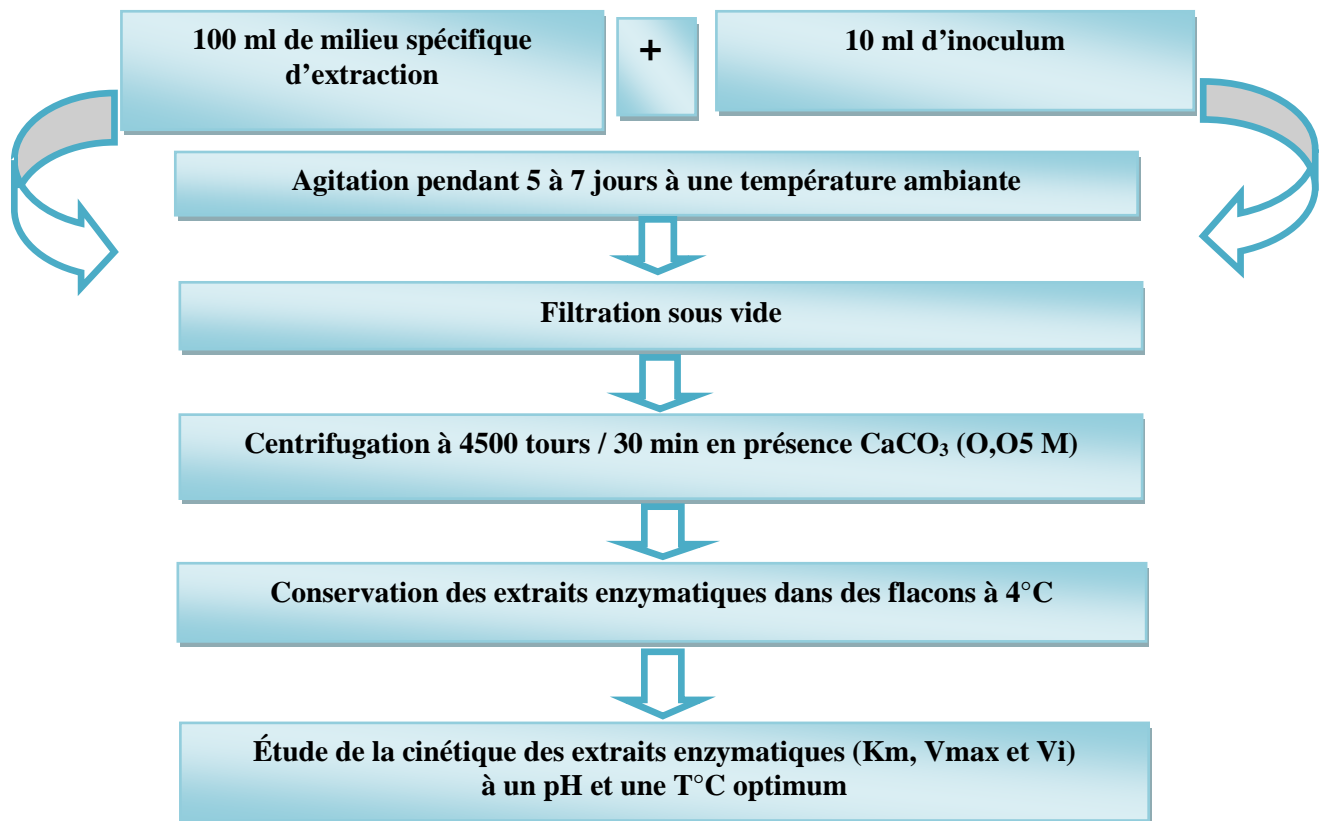
Sur une lame et à l'aide d'une pipette Pasteur, on dépose une colonie d'actinobactérie et on ajoute de l'eau oxygénée. Le dégagement d'oxygène indique que le résultat est positif, la souche contient une enzyme ayant la propriété de décomposer le peroxyde d'hydrogène (**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**)

#### **8.6. Hydrolyse de la gélatine**

Ce test a été réalisé sur le milieu nutritif gélosé contenant 1% de gélatine (**Annexe I**) selon la méthode de **Williams et Cross (1971)**. Le milieu a été coulé dans des boîtes de Pétri puis ensemencé par des stries de la souche et incubé à **30°C**, permet de mettre en évidence la dégradation de gélatine, qui se traduit par la présence d'une auréole claire autour des colonies

#### **9. L'activité enzymatique**

L'activité enzymatique des isolats d'actinomycètes est mise en évidence par deux criblages. Le premier criblage, réalisé sur le milieu solide, consiste à sélectionner le meilleur isolat producteur de l'amylase. Ce dernier sera utilisé dans la fermentation submergée réalisé sur le milieu liquide. Cette fermentation va être suivie d'une extraction de la fraction soluble des extraits enzymatiques (fig. 6).



**Fig. 6:** Protocole expérimental de l'extraction des extraits enzymatiques (Oomah *et al.*, 2011).

### 9.1. Préparation d'inoculum

Les isolats du criblage primaire qui ont une zone d'hydrolyse amidon important ont été sélectionnés pour la fermentation. Les souches d'actinobactéries déjà identifiées sont ensemencées en surface sur un milieu Bennett gélosé dans un Erlenmeyer. Après 7 à 10 jours d'incubation à  $30^\circ\text{C}$ , les spores sont raclées par ajout de 10 ml de bouillon Bennett stérile suivie d'une agitation vigoureuse. Le comptage des spores a été estimé par mesure de l'absorbance à 620 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV-visible. Des dilutions décimales sont effectuées en cas où l'inoculum est concentré, pour obtenir une suspension sporale de  $10^6$  spore/ml.

### 9.2. La fermentation submergée

La fermentation submergée a été réalisée dans un volume de 100 ml d'un milieu liquide spécifique pour l'extraction des amylases (Annexe I). Ce dernier a été inoculé par 10 ml de la suspension sporale de  $10^6$  spore /ml dans des conditions aseptiques. Cette technique a été mise en agitation à une vitesse de 120 tours pendant 5 à 7 jours.

### 9.3. Extraction l'extraction brute des amylases

L'extraction consiste à libérer les enzymes des cellules ou des constituants cellulaires. Elle nécessite un éclatement de la paroi ou de la membrane cellulaire, par des procédés physico-

chimiques (**Laurent, 1982**). Une filtration sous vide sur le charbon actif a été effectuée pour séparer le mycélium et récupérer le filtrat. Ce dernier a été traité par la bicarbonate de sodium 0,05M (VV). Ensuite, une centrifugation a été établie pour extraire la fraction enzymatique, le surnageant est récupéré puis conservé dans des flacons à 4° C, pour tester l'activité enzymatique des amylases (**Oomah et al., 2011**).

#### **9.4. Dosage colorimétrique des extraits enzymatiques par la méthode de Biuret**

En milieu alcalin le cuivre divalent réagit avec les liaisons peptidiques des protéines pour former le complexe du biuret, de coloration violacée caractéristique (**Doumas et al., 1981**) Les acides aminés isolés et les dipeptides ne forment pas de composé coloré en présence de cuivre (CuSO<sub>4</sub>), deux liaisons peptidiques adjacentes sont nécessaires. Il apparaît une coloration violet-rose devenant de plus en plus bleue. Cette coloration est due à la formation, au niveau des groupes aminés libres, de complexes amino cuivriques. L'intensité de la coloration est directement proportionnelle à la concentration en protéines. Le tartrate de potassium et de sodium empêche la précipitation de l'hydroxyde de cuivre et l'iodure de potassium (KI) empêche l'auto-réduction du cuivre.

##### **Mode opératoire**

- Préparer de la solution mère d'ovalbumine à 0,5g/100ml d'eau distillée ;
- Préparer des dilutions à partir de la solution mère : 0,1 ; 0,2 ; 0,3 ; 0,4 ; 0,5 ; 0,6 ; 0,7 ; 0,8 ; 0,9 ; 1 ml compléter à 10 ml d'eau distillée. Ajouter 4 ml du réactif Biuret ;
- Agiter et incuber à 15 mn à température ambiante ;
- Mesurer l'absorbance à une longueur d'onde 540 nm en utilisant un spectrophotomètre UV-visible ;
- On trace la courbe de la densité optique en fonction de la quantité d'ovalbumine tableau 5

#### **9.5. Étude cinétique des extraits enzymatiques**

##### **9.5.1. Préparation de la gamme d'étalonnage du glucose**

Une gamme de dilution de glucose a été préparée pour mettre en évidence le sucre réducteur libéré à partir de l'amidon après l'hydrolyse enzymatique. Cette réaction est basée sur l'intensité de la coloration du réactif Fehling en fonction de la quantité de sucres réducteurs.

##### **Mode opératoire**

La préparation des différentes dilutions (0,1 ; 0,2 ; 0,3 ; 0,4 ; 0,5 ; 0,6 ; 0,7 ; 0,8 ; 0,9 ; 1) ont été effectuées à partir d'une solution mère du glucose de concentration 1g/L.

- Ajouter 1ml de tampon acétate de sodium à 0,5M ;
- Ajouter 3 ml du réactif Fehling.
- Chauffer les tubes pendant 5 minutes dans un Bain-marie à 40°C ;

- Ajouter 3 ml dans les tubes laisser refroidir pendant 3 minutes environ ;
- Mesurer l'absorbance DO à 540 nm en utilisant un spectrophotomètre UV-visible ;
- Tracer la courbe de la densité optique en fonction de la de glucose oxydé en  $\mu\text{mol}$  [DO = f (C)] (tab. 6 annexes 2).

### 9.5.2. La cinétique des extraits enzymatiques

La cinétique enzymatique a pour objet d'identifier et de décrire les mécanismes des réactions biochimiques, catalysées par les enzymes des différents isolats (réaction enzymatique), a travers la détermination les paramètres cinétiques  $K_m$ ,  $V_{\max}$  et  $V_i$  à un pH constant de 5 et température optimale (40°C) tableau 7, annexe 2).

### 10.2.2. La cinétique des extraits enzymatiques

La cinétique enzymatique a pour objet d'identifier et de décrire les mécanismes des réactions biochimiques, catalysées par les enzymes des différents isolats (réaction enzymatique), a travers la détermination les paramètres cinétiques  $K_m$ ,  $V_{\max}$  et  $V_i$  à un pH constant et température optimale (40°C) (tab. 5 annexe 3).

- **Mode opératoire :** 1 ml de l'extrait enzymatique est ajouté à 1ml de la solution du substrat, après agitation le mélange est incubé à 40°C pendant 30 minutes avec un tube témoin représenté par le blanc. La réaction est arrêtée par l'addition de 1 ml du réactif Fehling et chauffé à 40°C pendant 10 minutes. Après refroidissement dans un bain de glace, 10 ml d'eau distillée sont ajoutés. L'absorbance est déterminé à  $\lambda = 540 \text{ nm}$  contre un essai à blanc. La concentration des sucres réducteurs correspondants est déterminée à partir de courbe étalonnage établie avec des concentrations du glucose variant de 1 à 10 mg/100 ml. Les préparations des solutions réactifs Feheling, solution du substrat et le tampon acétate sont détaillées en annexe II.

Remarque : La détection de sucre réducteurs a été estimée parla méthode de Fehling vu l'indisponibilité du réactifs dinitrosalicilyque.

La détermination des paramètres cinétiques des extraits enzymatiques d'amylase dans un tampon acétate pH 5,2 est mise en évidence par la courbe de la gamme des dilutions du glucose en présence du réactif de Fehling (**Annexe2**). La variation de la concentration en substrat (amidon) dans le milieu réactionnel et dans des conditions optimales (pH et température) permet de déterminer les paramètres cinétiques  $K_m$  et  $V_{\max}$  de l'amylase. Nous avons utilisé la courbe d'étalonnage du glucose comme produit par l'équation de Michaelis-Menten pour évaluer la constante vitesse initiale de la réaction de notre préparation enzymatique.

$$V_i = V_{\max} * [S] / V_{\max} + [S]$$

**$V_i$**  : Vitesse initiale d'oxydation ( $\mu\text{mol.l}^{-1}.\text{min}^{-1}$ );

**$V_{\text{max}}$**  : Vitesse maximale d'oxydation ( $\mu\text{mol.l}^{-1}.\text{min}^{-1}$ );

**[S]** : Concentration en substrat (Amidon) ( $\text{mol.l}^{-1}$ );

**$K_m$**  : Constante de Michaelis ( $\text{mol.l}^{-1}$ ); elle correspond à la valeur de [S] pour laquelle  $V_i = V_{\text{max}}/2$ .

## IV. Résultats et discussion

### 1. Étude morphologique des actinomycètes

Les milieux de culture utilisés pour l'isolement des actinobactéries sont Bennett et caséine-amidon agar. Ce dernier milieu et avec l'utilisation du prétraitement par  $\text{CaCO}_3$  on a obtenu des meilleurs résultats. Un nombre important des actinobactéries de différents genres est enregistré sur le milieu caséine amidon agar et qui dépasse dix isolats. Parmi ses isolats, trois souches sont identifiées et caractérisées par des observations à la loupe binoculaire et au microscope optique et par des différents tests physiologiques et biochimiques au tant que des *Streptomyces* sp.

#### 1.1. Aspect macroscopique

Après la sélection et la purification, les colonies d'actinomycètes sont reconnues sur la base de leurs aspects morphologiques qui expriment un polymorphisme génétique des isolats (S1, S2 et S3). Des variations morphologiques visibles à l'œil nu sont observées telles que les tailles de colonies qui varient entre 1 mm à 3,2 mm (fig. 7).

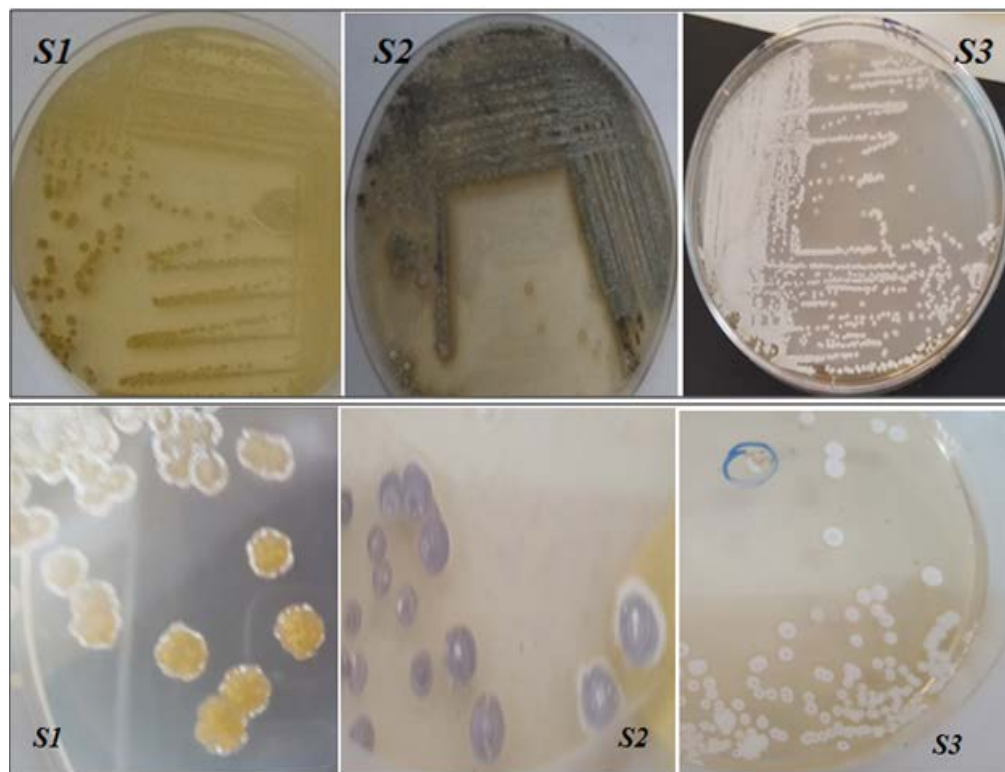


Fig. 7: Observations macroscopiques des colonies d'actinobactéries à l'aide d'une loupe binoculaire.

Une diversité de couleur est notée pour les trois souches isolées et qui exprime la présence d'un polymorphisme de couleur (tab. 5 ; fig. 7).

Les formes des colonies sont caractéristiques pour chaque isolat. Une forme bombée est observée pour les souches S1 et S2 par contre la souche S3 présente une forme aplatie (tab. 5).

**Tableau 5** : Caractérisations macroscopiques des isolats d'actinobactéries.

		Couleurs	Aspects	Formes	Taille
Souches d'actinobactéries	S1	Jaune	Rigoureuses	Aplaties	1 à 3 mm
	S2	Grise	Lisse et poudreuse	Bombée	
	S3	Blanche	Lisse et poudreuse	Bombée	

Selon **Messaoudi (2003)**, **Omar, (2013)** et **Djebbah (2016)**, les diamètres moyens des actinomycètes varient de 1 à 5 mm. Elles présentent des formes variables, lisse, bombé, aplatie etc. Ainsi que, leurs mycélium végétatifs sont surmontés des mycéliums aériens de couleurs différentes jaune, blanche, marron, beige, brun etc la couleur et des couleurs.

### 1.2. Aspect microscopique

Les observations microscopiques montrent comme chez tous les *Streptomyces*, sont des bactéries à Gram positif (fig. 8).

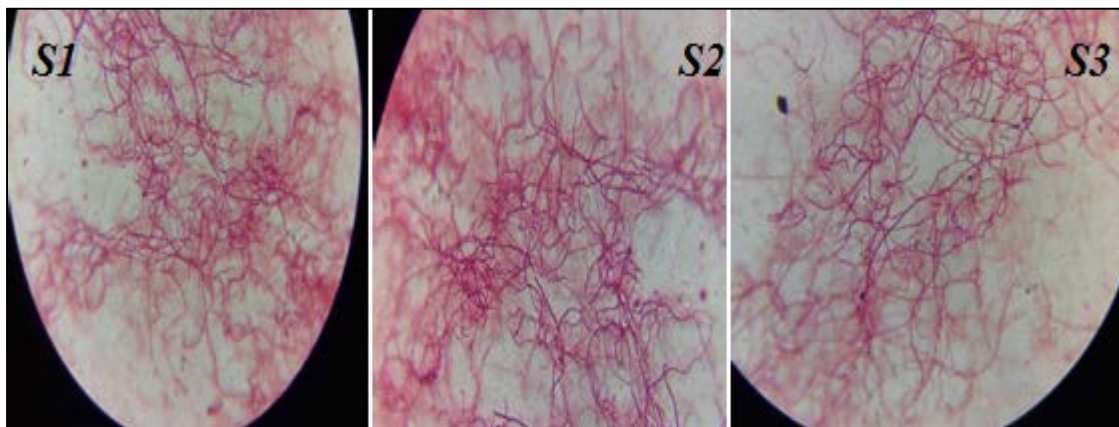


Fig. 8 : Observation microscopique des mycéliums de *Streptomyces sp.*  
à coloration de Gram (G x100).

Les observations au microscopique révèlent que toutes les souches de *Streptomyces sp* isolées sont des bactéries filamenteuses, à coloration de Gram positive. Le mycélium végétatif des souches présentent une structure cloisonnée avec un nombre limités de sporanges, qui sont des sacs contenant des endospores. Selon **Neil et Brown (1994)** et **Cheriet et al. (2016)**, le mycélium aérien des *Streptomyces* est bien développé, ramifié, non fragmenté, portant des sporanges ou des vésicules globuleuses et sphériques contenant des spores.

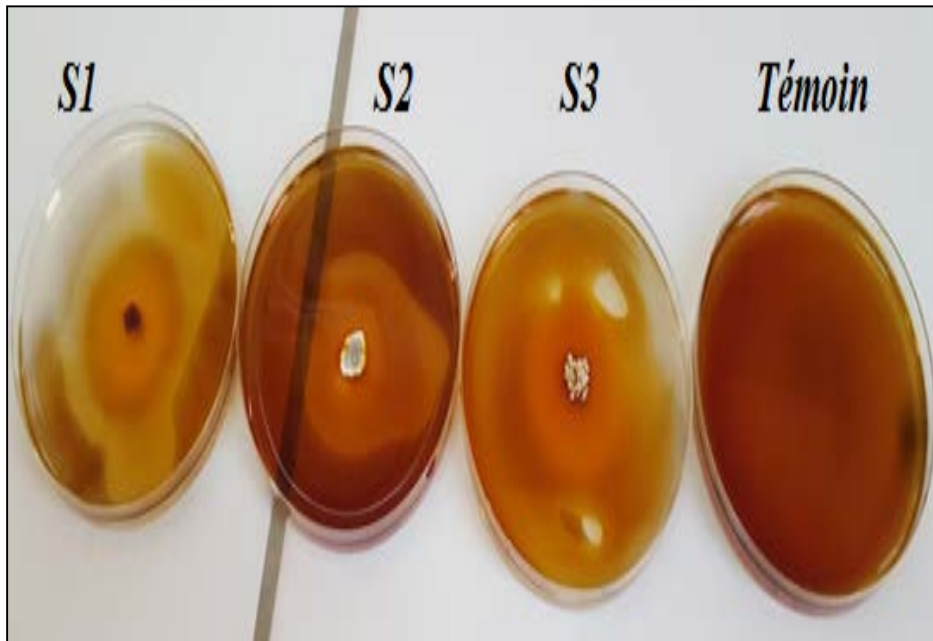
Les spores des actinobactéries résultent d'une série de changements et de développement des hyphes aériens. Les résultats obtenus se concordent avec cette description.



## 2. Tests physiologiques et biochimiques

### 2.1. Hydrolyse l'amidon

Le test d'hydrolyse d'amidon est positif pour les isolats d'actinomycètes, l'absence de coloration bleue autour des colonies bactériennes, signifie que l'amidon est hydrolysé de dans cette zone. Cette hydrolyse est du à la présence des amylases dans le milieu qui sont sécrétés par les bactéries. Par contre, cette couleur devienne bleue foncé dans le reste du milieu (fig. 9). Cela explique la présence de l'amidon dans le reste du milieu.



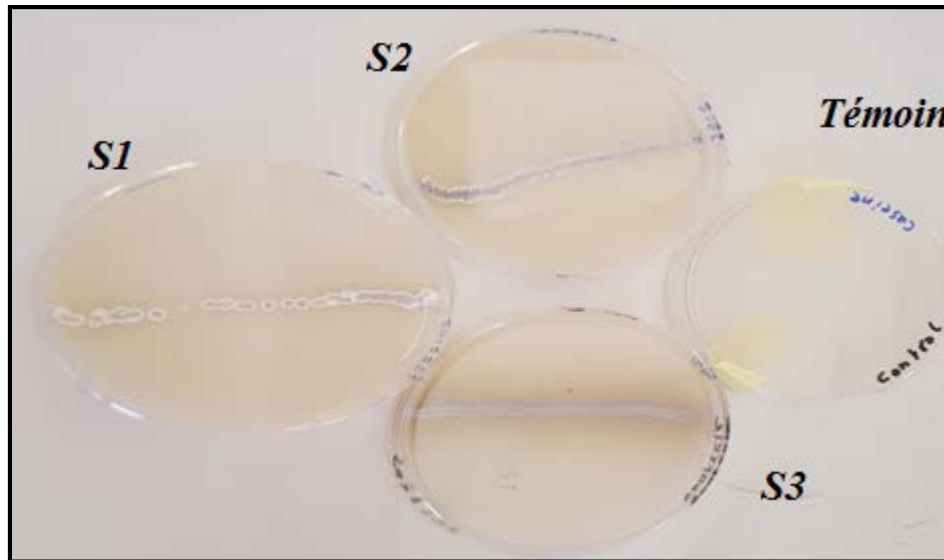
**Fig. 9 :** Test positif d'hydrolyse de l'amidon en présence des isolats de *Streptomyces sp.*

Plusieurs travaux entrepris sur l'hydrolyse de l'amidon par les *Stréptomyces sp* confirment les résultats obtenus (Vigal *et al.*, 1991 ; Stamford *et al.*, 2001 ; Hakraborty *et al.*, 2009).

### 2.2. Hydrolyse de la caséine

Autour des souches bactériennes isolées, on voit clairement la présence des zones claires comparant avec le milieu de la boîte témoin et les zones des mêmes milieux de cultures hormis les souches actinomycètes. Le test d'hydrolyse de la caséine est positif pour les tous isolats d'actinomycètes (fig. 10).



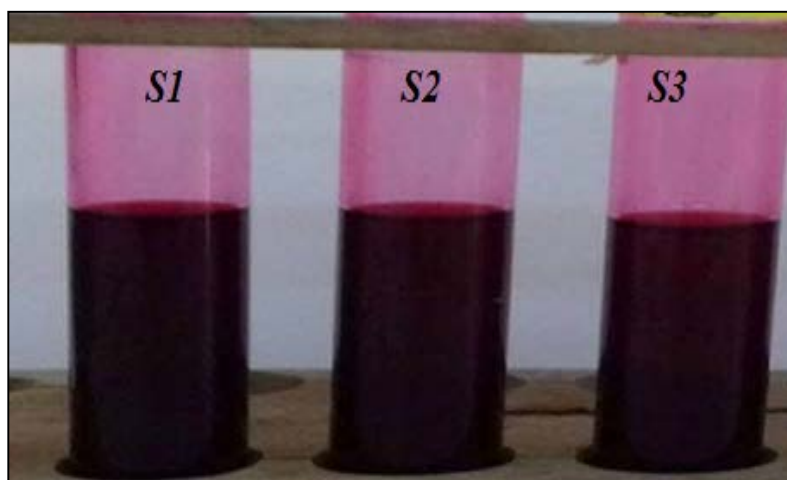


**Figure 10 :** Test d'Hydrolyse de la caséine est positif pour les isolats de *Streptomyces* sp.

La présence de ces zones claires signifie que la caséine présente dans le milieu de culture a été hydrolysée par les souches. Nos résultats sont en accord avec ceux présentés par **El\_Shefi et al. (2010)**, où ils ont montré que *Streptomyces* est productrice d'une enzyme protéolytique sur un milieu à base de lait écrémé. Ainsi que les travaux de **Gulve et Deshmukh (2011)**, ont signalé que les genres : *Streptomyces* sp possèdent une activité protéolytique ; liée particulièrement à l'enzyme caseinase (**Cheriet et al., 2016**).

### 2.3. Dégradation de l'urée

La couleur du milieu teinte rouge qui indique la dégradation de l'urée. Cela signifie que les isolats de présentent un test positif, ce qui veut dire que les souches bactérienne possèdent l'enzyme uréase. Cet enzyme permet d'hydrolyser l'urée contenue dans le milieu urée-indole (Fig. 11).

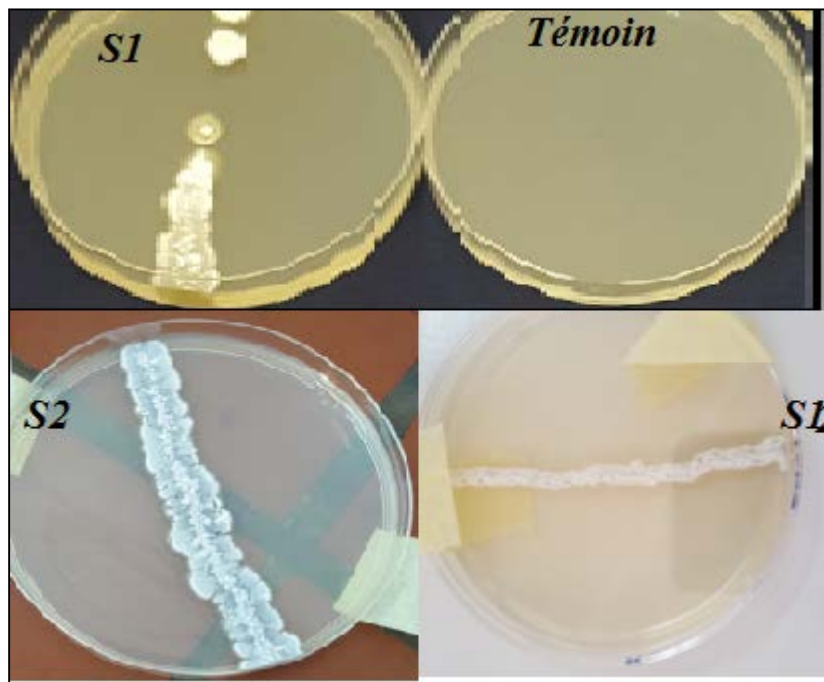


**Fig 11:** Test positif de dégradation de l'urée en présence des isolats de *Streptomyces* sp.

Les mêmes résultats sont obtenus par les chercheurs montrant que les souches de *Streptomyces* sp peuvent dégrader l'urée (Cheriet *et al.*, 2016).

#### 2.4. Hydrolyse de la gélatine

La gélatine est un polymère protéique thermoréversible, leur incorporation dans le milieu de culture a permis de tester la capacité des isolats de *Streptomyces* sp à hydrolyser cette protéine. Les résultats obtenus de ce test sont positifs, ils montrent que la gélatine du milieu a été hydrolysée par la gélatinase sécrétée par les souches (fig. 12).



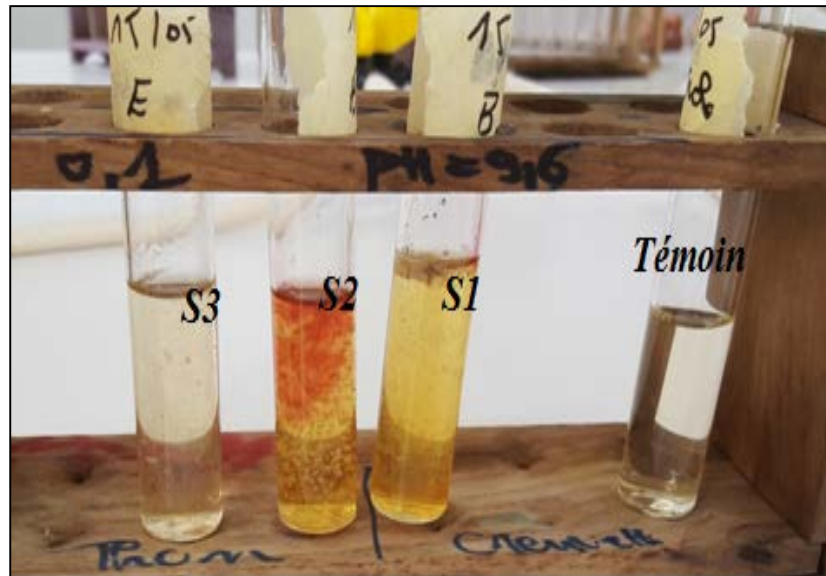
**Figure 12:** Test positif d'hydrolyse de la gélatine en présence des *Streptomyces* sp.

Les mêmes résultats sont obtenus par plusieurs chercheurs qui ont travaillé sur les actinomycètes des sols tels que Cheriet *et al.* (2016).

#### 2.5. Réduction des nitrates

La figure ci-dessous montre que le test des nitrates est positif dans les souches (S1, S2) de *Streptomyces* sp. Ces isolats de *Streptomyces* sp présentent un changement de couleur (rouge) indiquant que les nitrates du milieu sont transformés en nitrites (fig. 13). Cela explique que les bactéries de cette souche possèdent l'enzyme nitrate réductase très active.

La couleur du milieu n'a pas changé en présence des réactifs NR1 et NR2 et même lorsque on a ajouté la poudre de Zn pour la souche S3 (fig. 13).



**Figure 13:** Tests réduction des nitrites positif en présence S1 et S2 et négatif avec les Souches S3.

Ce résultat négatif obtenu avec la souche S3 a été déjà indiqué par (Yous et Bendris, 2017).

## 2.6. L'utilisation de citrate

Les résultats obtenus avec les différents isolats de *Streptomyces* sp sont négatifs, les souches n'ont pas utilisés le citrate du milieu comme source de carbone (fig. 7). La couleur du milieu est restée vert et elle n'a pas virée vers le bleue.

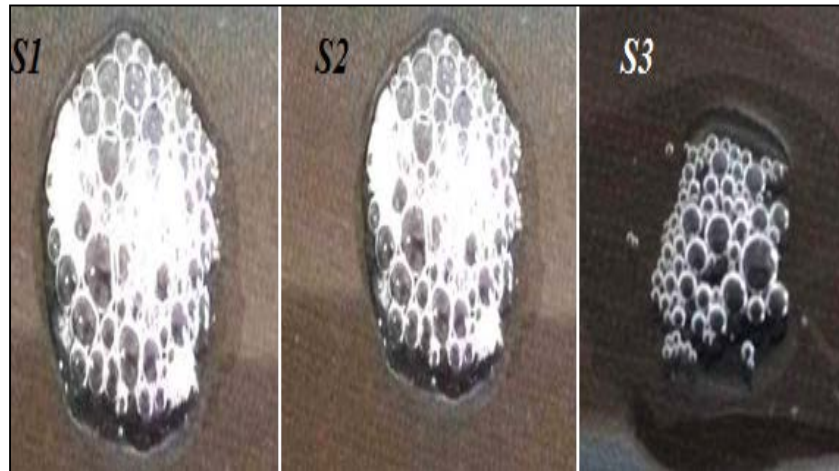


Figure 14 : Test négatif d'utilisation de citrate en présence des isolats de *Streptomyces* sp.

Les mêmes résultats obtenus ont été publiés par Zhang *et al.* (2014).

### 2.7. Recherche de Catalase

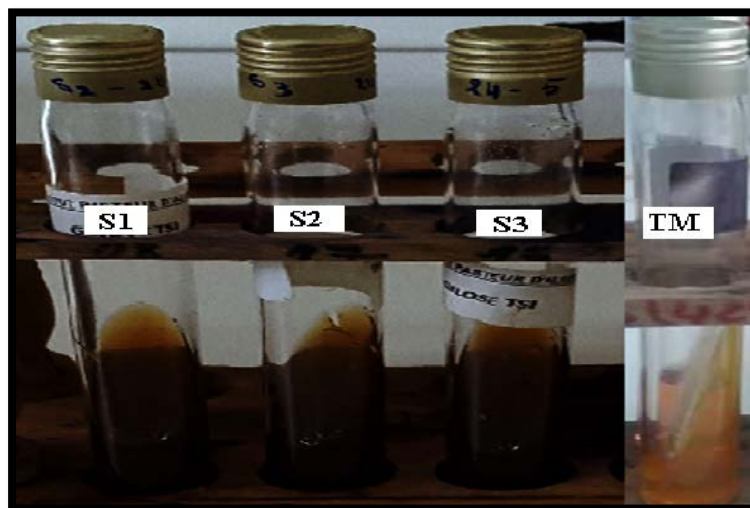
Le test de la recherche de catalase est positif pour l'ensemble des isolats de *Streptomyces* sp (S1, S2, S3.) (fig. 15). Les mêmes résultats sont obtenus par **Zhang *et al.* (2014)** ; **Amara et Khaldi, (2015)**.



**Figure 15** : Test de catalase des trois isolats de *Streptomyces* sp.

### 2.8. Production d'H<sub>2</sub>S

Les isolats (S1, S2, S3.) de *Streptomyces* sp présentent un test positif d'où on a noté un noircissement du culot au fond des tubes de TSI. Cela explique que les souches bactériennes sont productrices de H<sub>2</sub>S (Fig. 16).

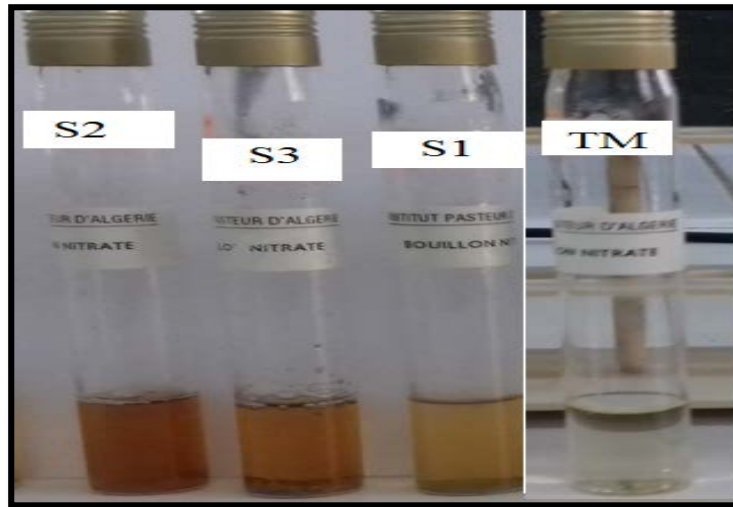


**Figure 16** : Tests positifs de production d'H<sub>2</sub>S avec les trois souches *Streptomyces* sp. Ces résultats sont similaires à ceux qui ont été obtenus par **Abdelkhalek (2017)**.

### 2.9. Les réactions de VP et RM

Les tests de VP et RM sont positifs, la couleur à virer vers le rouge (fig. 17). Les souches d'actinomycètes (S1, S2, S3) assurent les réactions fermentation des acides mixtes et du

butylène glycolique en présence des réactif RM et VP avec production d'acétoïne ou 3-hydroxy-butanone.



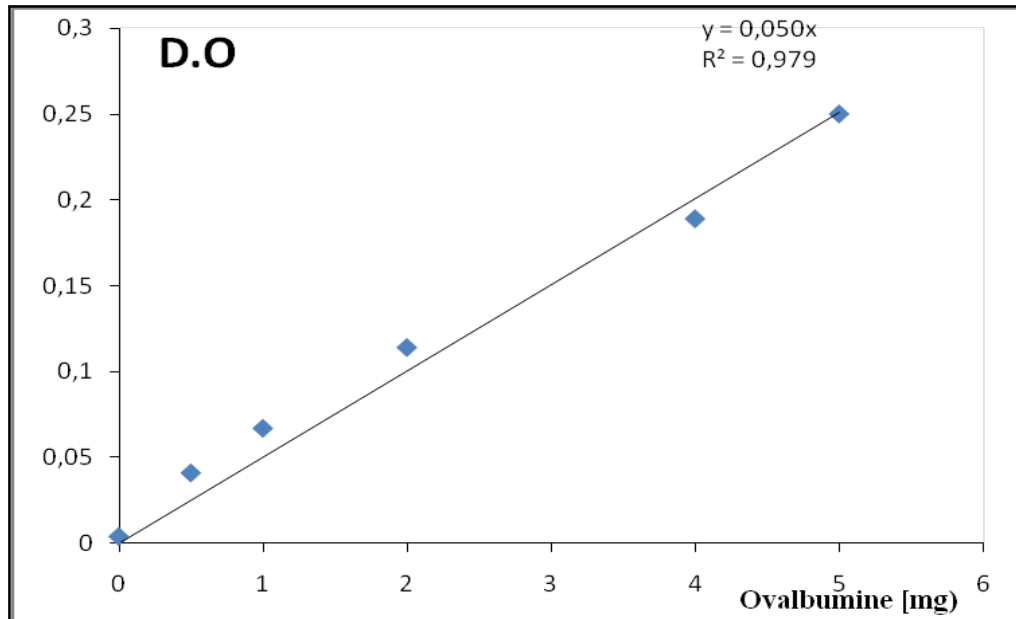
**Figure 17 :** Tests de VP et RM positifs pour les isolats de *Streptomyces* sp.

Les mêmes résultats sont obtenus par plusieurs chercheurs **Kannabira et Deepika, (2009)**, **Dhananjeyan et al. (2010)** ; **Vengadesh et al. (2011)** et **Kalyani et al. (2012)** et **Djebbah (2016)**.

### **3. Production des extraits enzymatique des isolats *Streptomycètes* sp**

#### **3.1. Dosage des extraits enzymatiques par la réaction de Biuret**

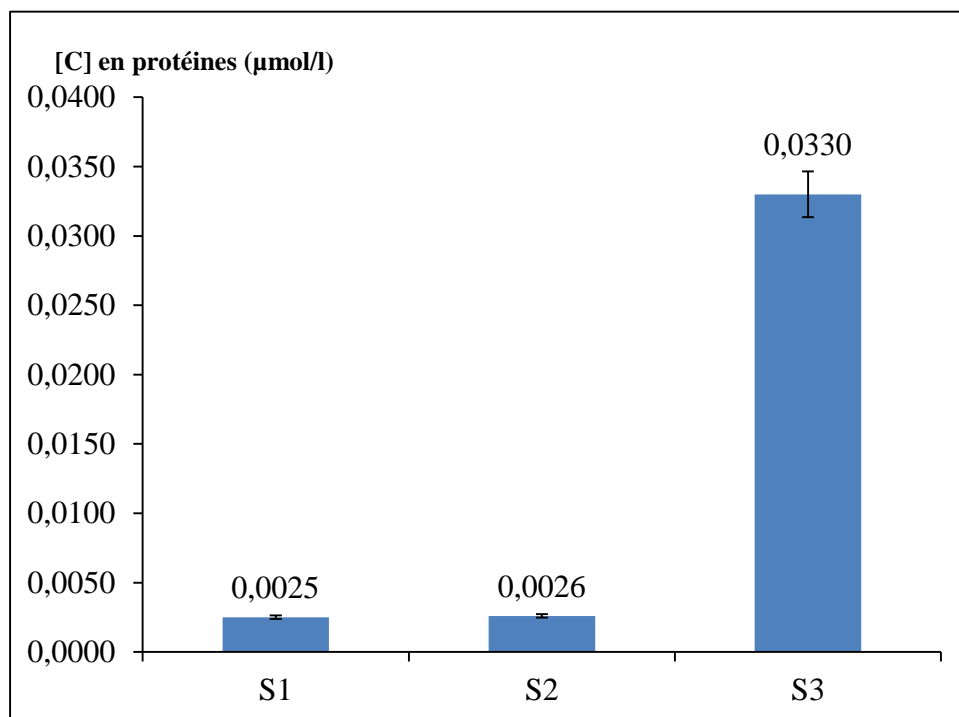
Les quantifications des extraits enzymatiques des isolats de *Streptomyces* sp .par la technique de biuret sont réalisées par le dosage de la protéine ovalbumine. Cette quantification est réalisée grâce à la courbe d'étalonnage des dilutions de la protéine ovale albumine dans les mêmes conditions opératoires (pH= 5,2 et T= 40°C) (18).



**Fig. 18 :** Courbe de la gamme d'étalonnage de la protéine ovalalbumine.

Les figures 18 et 19 représentent respectivement la gamme d'étalonnage d'ovale albumine et les concentrations des extraits enzymatiques des trois isolats de *Streptomyces* sp.

Les résultats obtenus sur les concentrations des extraits protéiques confirment les résultats des tests d'hydrolyses. L'isolat de *Streptomyces* sp S3 renferme une concentration protéique supérieur par rapport aux autres isolats (fig. 19).



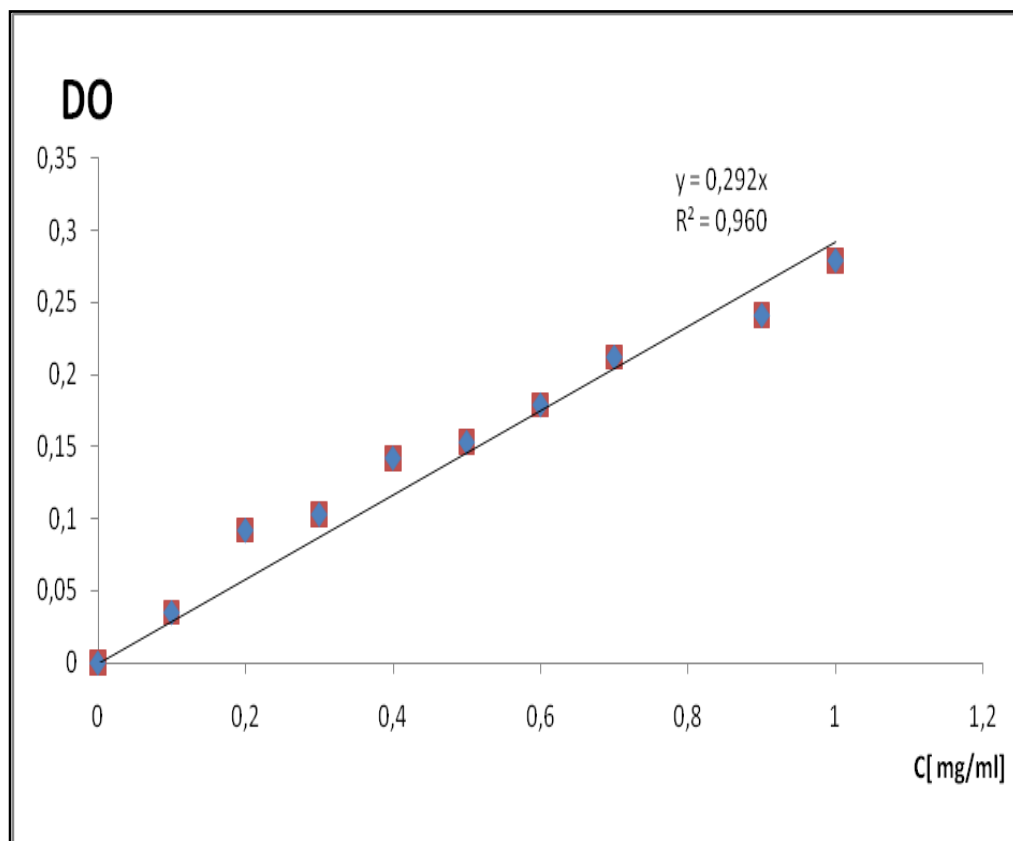
**Fig. 19 :** Les concertations des extraits protéique des trois isolats *Streptomyces* sp.



Les valeurs sont respectivement de 0,033 ; 0,0026 et 0,0025  $\mu$  mol/l. Les résultats obtenus sont cohérents avec ceux obtenus par les tests des paramètres cinétiques  $K_m$ ,  $V_{max}$  et  $V_i$  qui seront présentés et discuté ci-dessous.

### 3.2. Cinétique des extraits d'amylasiques des isolats *Streptomyces* sp

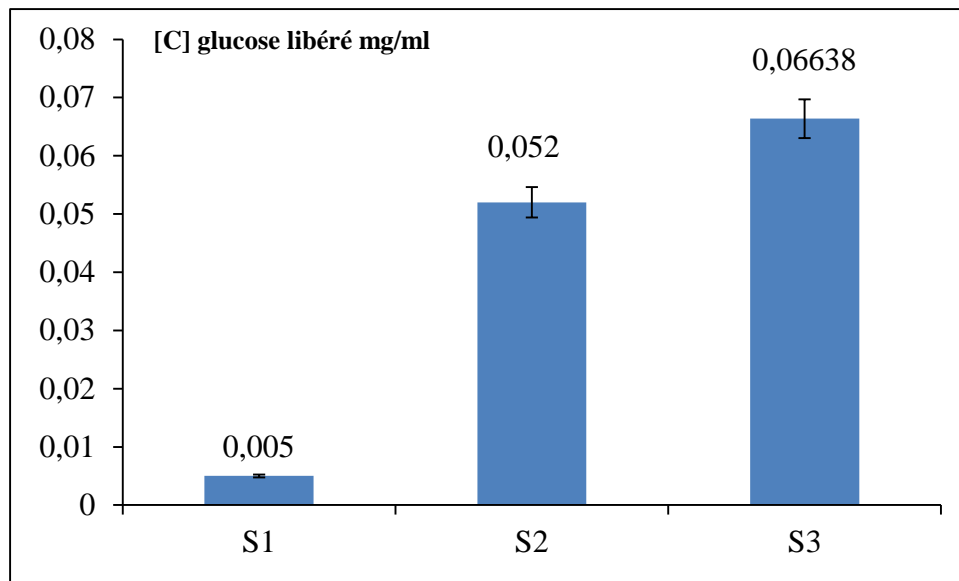
Les extraits enzymatiques des amylases obtenus à partir des isolats de *Streptomyces* sp sont utilisés bruts, et dilués pour l'étude de la cinétique d'hydrolyse de glucose. Cette cinétique est estimée par la technique colorimétrique de la réduction du réactif liqueur de Fehling. Ceci nécessite le dosant d'un sucre réducteur pur préparé à différentes concentrations comme le glucose, avec le sucre réducteur libéré (glucose) par les extraits enzymatiques après hydrolyse du substrat l'amidon (fig. 20 et fig. 21).



**Fig. 20 :** Courbe de la gamme d'étalonnage du sucre réducteur pur le glucose.

La gamme d'étalonnage du sucre réducteur glucose pur présente un coefficient de régression positif  $R^2 = 0,96$  très proche de la valeur 1. Cela signifie que les différentes dilutions sont bien en linéarité. Cette courbe va servir à estimer les quantités du produit libéré, après l'hydrolyse du substrat l'amidon.

Le dosage des produits libérés au cours des différentes réactions présentent respectivement des valeurs de 0.066 et 0.052  $\mu\text{mol}$  de glucose /ml pour les isolats S3 et S2.



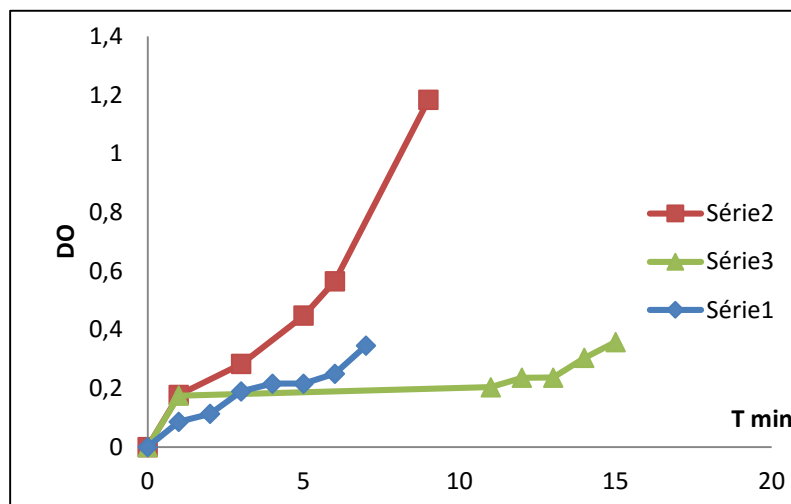
**Fig. 21 :** Les quantités du glucose libéré après hydrolyse d'amidon obtenus en présence des Extraits enzymatiques de *Streptomyces* sp.

Cette méthode confirme que les extraits enzymatiques sont riches en amylases. Selon **Ragunatha et Padhmadas, (2013)**, les *Streptomyces* sont une source importante des enzymes amylases.

#### 4.3. Mesure des paramètres cinétiques

Les courbes des cinétiques enzymatiques des extraits d'amylases des trois souches en fonction du temps permettent de caractériser les activités enzymatiques par les constantes cinétiques (**tab. 6, fig. 22**). La variation de la concentration en substrat (amidon) au cours de la réaction et dans des conditions optimales (pH et température) permet de déterminer les paramètres cinétiques  $K_m$  et  $V_{max}$  de l'amylase.





**Fig. 22:** Cinétique enzymatique des extraits d'amylases en fonction du temps.

On constate une variation dans les activités amyliques des extraits enzymatiques des trois souches en fonction du temps (fig. 21). D'après la figure ci-dessus, les extraits enzymatiques hydrolysent le substrat d'amidon progressivement en fonction du temps. On remarque que les extraits des souches S3 et S2 présentent des densités optiques un peu élevées à celle de l'extrait de la souche S1 (fig. 21). Théoriquement, cette densité est proportionnellement à la concentration du produit de l'hydrolyse d'amidon, qui le glucose.

Grâce à ces courbes cinétiques, les quantités des produits sont obtenues en utilisant la courbe de la gamme d'étalonnage du glucose. La quantification des produits permet de déterminer les vitesses des réactions et les concentrations du substrat hydrolyser pour tracer les courbes  $V_i = f([S])$  et calculer les paramètres cinétiques (tab. 6).

**Tableau 6 :** Les paramètres cinétiques des extraits d'enzymes des isolats de *Streptomyces* sp.

Les souches	Km	Vmax mol l <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup>	V <sub>i</sub> mol l <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup>
S1	0,20×10 <sup>-3</sup>	0,33×10 <sup>-3</sup>	0,06
S2	0,12×10 <sup>-3</sup>	0,13×10 <sup>-3</sup>	0,125
S3	0,10×10 <sup>-3</sup>	0,20×10 <sup>-3</sup>	0,24

Les valeurs du Km les plus faibles sont notés pour les souches de *Streptomyces* sp. S3 et S2 avec des vitesses supérieures par rapport à la souche S1 (tab.6). Le Km traduit l'affinité de l'enzyme avec le substrat (amidon), plus le Km est faible plus cette affinité augmente. Les souches de *Streptomyces* sp. S3 et S2 présentent une bonne affinité avec le substrat amidon comparant avec la souche S1.

Plusieurs travaux ont été réalisés sur les activités des amylases de *Streptomyces* sp. isolées du sol confirment ses résultats (Khawaja, 2011 ; Ragunathan et Padhumadas, 2013).

## **Conclusion et perspectives**

Les résultats de l'isolement des actinomycètes du sol sur deux milieux solides différents et l'utilisation du traitement avec  $\text{CaCO}_3$  montrent une abondance des actinomycètes sur le milieu agar caséine amidon comparant avec le milieu Bennett.

Cependant, après la sélection, la purification des isolats d'actinomycètes, ainsi que, les observations macroscopiques, microscopiques, suivie des tests physiologiques et biochimiques, trois isolats d'actinomycètes présentent les caractéristiques des *Streptomyces* sp. Les colonies obtenues sont de tailles différentes petite, moyenne et grande, dont leurs diamètres varient de 1 à 3 mm. Plusieurs formes de colonies sont obtenus (lisse, bombé, aplatie), avec un mycélium végétatif (mycélium aérien) de couleurs variables (jaune, marron, et blanche etc.). L'examen microscopique révèle que les bactéries sont de Gram positif.

Les tests physiologiques (tests d'hydrolyses de caséine, de l'amidon et de l'urée), ainsi que, les tests biochimiques (hydrolyse de gélatine, la production de  $\text{H}_2\text{S}$ , tests de catalase, la réduction des nitrates et utilisation de citrate) sont positif pour tous les isolats, à l'exception l'isolat S3 où le test de nitrate est négatif.

La quantification des extraits enzymatiques des isolats de *Streptomyces* sp. par la technique de biuret, dans les mêmes conditions opératoires ( $\text{pH} = 5,2$  et  $T = 40^\circ\text{C}$ ), présent une concentration en protéique de  $0,033 \times 10^{-2} \mu\text{mol/l}$  pour l'isolat de *Streptomyces* sp S3, et respectivement de  $0,0025 \times 10^{-2}$  et  $0,0025 \times 10^{-2} \mu\text{mol/l}$  pour les autres isolats S2 et S1.

Les résultats de la cinétique enzymatique des extraits amyliques montrent une variation dans les activités amyliques. Les souches de *Streptomyces* sp. S2 et S3 présentent une bonne affinité avec le substrat amidon, les valeurs du  $K_m$  sont très faibles de  $0,12 \times 10^{-3}$  et  $0,10 \times 10^{-3}$  respectivement. Les vitesses initiales des réactions varient selon les extraits enzymatiques ( $S1(V_i) = 0,06 \mu\text{mol l}^{-1}\text{min}^{-1}$ ,  $S2(V_i) = 0,125 \mu\text{mol l}^{-1}\text{min}^{-1}$ ,  $S1(V_i) = 0,24 \mu\text{mol l}^{-1}\text{min}^{-1}$ ).

En perspectives, il est recommandé dans la venir de :

- Approfondir cette étude par l'identification chimio-taxonomique et la biologie moléculaires et génie génétique les espèces des différentes souches de *Streptomyces* sp isolées.
- Etudier la production des enzymes potentiellement produites par les souches, telles que les amylases par d'autres méthodes d'extractions et de purifications.

**I. Composition des Milieux de cultures et des solutions****1. Composition des Milieux de cultures****Milieu Bennett**

Extrait de levure.....	2g/l
Extrait de viande.....	1g/l
Peptone.....	2g/l
Glucose.....	10g/l
Eau distillée.....	1L
pH = 7,3	

**Caséine amidon agar**

Amidon.....	10g
Caseine.....	0,3 g
KNO <sub>3</sub> .....	2 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	0,02g
NaCl.....	2g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O.....	2 g
CaCO <sub>3</sub> .....	0,05 g
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> .....	0,01g
Agar.....	18g
Eau distillée.....	1L
PH = 7.3.	

**Gélose nutritive**

Amidon .....	10g
Peptone.....	5g
Extrait de viande.....	1g
Extrait de levure.....	2g
NaCl.....	5g
Agar.....	15g
Eau distillée.....	1L
PH= 7,5.	

**Citrate de Simmons**

Ammonium dihydrogenophosphate.....	1g
Phosphate de potassium.....	1g
Chlorure de sodium.....	5g
Citrate de sodium.....	2g
Sulfate magnésium.....	0,2g
Bleu de bromothymol.....	0,08g
Agar.....	15g
Eau distillée .....	1L
PH 6,8	

**Gélose TSI (Triple Sugar Iron)**

Peptone de viande.....	15g
Protéase peptone.....	5g
Extrait de viande.....	3g
Extrait de levure.....	3g
Glucose.....	1g
Saccharose .....	10g
Lactose.....	10g
Citrate de fer ammoniacal.....	0,3g
Chlorure de sodium .....	5g
Sodium thiosulfate.....	0,3g
Rouge de phénol.....	0,05g
Agar.....	18g
Eau distillée.....	1L
PH=7,2	

**Urée- indole**

L-tryptophane.....	3g
Phosphate de dipotassique.....	1g
Phosphate monopotassique.....	1g
Chlorure de sodium.....	5g
Urée.....	20g
Rouge de phénol.....	2,5g
Eau distillée.....	1L
PH =6,8	

**Bouillon Clark et Lubs**

Peptone.....	5g
Glucose.....	5g
Hydrogénophosphate de potassium.....	5g
Eau distillée.....	1L
PH = 7,5	

**Milieu d'Extraction**

Amidon.....	10g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	10g
Extrait de levure.....	05g
KCl.....	0.5g
MgSO <sub>4</sub> .....	0.15g
Eau distillée.....	1L
PH= 7,0	

## 2. Composition des solutions

### 2.1. Tampon acétate de Sodium à 0,05M

- 4,1g d'acétate de Na
- 100 ml d'eau distillé
- Ajuster le pH à 4,7 avec l'acide acétique dilué.

### 2.2. Préparation de la liqueur de Fehling

- **Solution cuprique A** : Sulfate de cuivre pur : 40 g ; Acide sulfurique : 2 ml ;  
Eau q.s.p : 1 l
- **Solution Tartarat-Alcaline B** : Tartrate double de sodium et de potassium : 200 g ;  
Soude : 150 g ; Eau q.s.p 1l:

### 2.3. Préparation de biuret

- Sulfate de cuivre  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  .....1,5g
- Tartarate double de potassium et de sodium.....6g
- NaOH .....30g
- Iode de potassium .....1g
- $\text{H}_2\text{O}$  : q.s.p.....1l

**Les références bibliographiques**

**Abdelkhalek, M., 2017**, Isolement des microorganismes (actinomycètes et moisissures) producteurs de substances antimicrobiennes à partir de la grotte Kaws–Honaine. Mémoire Master en microbiologie, Tlemcene. Pp 67

**Aboul-Enein, 2010**. Purification and characterization of a novel thermoactive cellulose from thermophilic actinomycetes isolated from soil sample of Egypt. Int. J. Academic Res., 2: 81 - 86.

**Agate A.D., Bhat J.V., 1963**. A method for the preferential isolation of actinomycetes from soils. Antonie Van leeuvenhoek. 29: 297-304.

**Alexander M., 1994**. Biodegradation and Bioremediation. Academic, Press, New York (USA).

**Aly M.M., Tork S., Al-Garni SM., Nawar L., 2012**. *Streptomyces* exfoliates LP10 isolated from oil contaminated soil. Afr. J. Microbiol. Res. 6: 1125-1137.

**Al-Zarban S.S., Al-Musallam A.A., Abbas I., Stackebrandt E., and Kioppenstedt R.M., 2002**. *Saccharomonospora halophila* sp. nov., a novel halophilic actinomycete isolated from marsh soil in Kuwait. Int. J. Sys. Env. Microbiol, 52: 555-558.

**AMARA I., et Khaldi Z., 2015**. Isolement, identification et étude de l'antibio-résistance des souches bactériennes isolées à partir de services de réanimation et d'hémodialyse de CHU Ouargla. Pp 31.32.

**Ameur H., 2014**. Effet d'osmoprotecteurs naturels sur la restauration de croissance de *Streptomyces* et de plantes d'intérêt agricole sur sol salé ou aride. Pp 36-37-38-39.

**Arijit D., Sourav B., Naimisha R.V., and Rajan S.S. 2013**. Improved Production and Purification of Pectinase from *Streptomyces* sp. GHBA10 isolated from Valapattanam mangrove habitat, Kerala, India, Inter. Res. J. Biol. Sci. 2, pp 16-22.

**Artiola-Fortuny J., & Fuller W.H., 1982**. Adsorption of some mono-hydroxybenzene derivatives by soils. Soil Science, 133: 218-227

**Becker B., Lechevalier M. P. et Lechevalier H. A. (1965)**. Chemical composition of cellwall preparation from strains of various from-genera of aerobic actinomycetes App. Microbiol. 13, 236-243.

**Bedjedj S., 2011**. Contribution à l'étude du fonctionnement microbiologique des sols dans la région d'Ouargla (cas de l'exploitation de l'université d'Ouargla). mém.ing.agro.

**Belyagoubi L., 2014**. Antibiotiques produits par des bactéries (actinomycètes et bactéries lactiques) issus de différents écosystèmes naturels Algériens. 91-92.

---

- Benaissa S., 2016.** Isolement des microorganismes (actinomycètes et moisissures) producteurs de substances antimicrobiennes à partir du sol d'une grotte dans la région de Tlemcen (Tagema), pp 1.
- Bentley S.D., Chater K.F., Cerdeno-Tarraga A.M., Challis G.L., Thomson N.R. 2002.** Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature* 417: 141-147.
- Berdy J., 2005.** Bioactive microbial metabolites. *J. Antibiot.* **58(1): 1-26.**
- Bhattacharya D., Nagpure A., Gupta R.K., 2007.** Bacterial chitinases: properties and potential. *Crit. Rev. Biotechnol* 27: 21-28.
- Bhattacharya D., Nagpure A., Gupta R.K., 2007.** Bacterial chitinases: properties and potential. *Crit. Rev. Biotechnol* 27: 21-28.
- Boughachiche F., Reghioua S., Oulmi L., Zerizer H., Kitouni M., Boudemagh A., and Boulahrouf., 2005.** Isolement d'actinomycétales productrices de substances antimicrobiennes à partir de la Sebkha de Ain Mlila. *Sciences & Technologie C*, 23 : 5– 10.
- Boullard B., et Moreau J., 1962.** Sol, microflore et végétation. Edition ; Masson; paris, 289p.
- Brzezinski R., Dery C.V., Beaulieu C., 1999.** Thermostable xylanase DNA, protein and methods in use," USA patent (587) 1730-1999.
- Calvet R., 2000.** Le sol propriétés et fonctions, constitution et structure, phénomènes aux interfaces. Tome 1. Edition France Agricole. Paris (France), 83-90.
- Cavala M., Eberlint T., 1994.** Isolement des *Streptomycètes* du sol. *L'opéron*. 4: 13-7.
- Chakraborty S., Raut G., Khopade A., Mahadik K., Kokare C., 2012.** Study on calcium ion independent  $\alpha$ -amylase from halo-alkaliphilic marine *Streptomyces* strain A3. *Indian J Biotechnol* 11: 427-437.
- Cheraiti N et GacemiKirane D., 2012.** Isolement des souches d'Actinomycètes productrices de nouvelles molécules antifongiques. *Rev. Microbiol. Ind. San et Environn.* Vol 6, N°1, p : 18-34.
- Cormick J.R., and Flårdh K., 2012.** Signals and regulators that govern *Streptomyces* development. *FEMS. Microbiol Rev*, 36(1): 206–31.
- Crawford D.I., Lynch., Whipps JM., Ousley M.A. 1993.** Isolation and Characterisation of actinomycete antagonists of a fungal root pathogen. *App. Environ. Microbiol.* 59,3899-3905.
- Crosnier J., 1999.** Devenir de la pollution métallique drainée par les eaux pluviales, influence du compartiment microbien et des alternances de dessiccation/réhumectation sur le
-



transfert du zinc dans la zone non saturée du sol. Thèse de Doctorat. Université de Claude Bernard – Lyon I (France).

**Dastager S., Dayanand A., Li W.J., Kim C.J., Lee J.C., 2008.** Proteolytic activity from an alkalithermo tolerant *Streptomyces gulbargensis* sp. nov. *Curr Microbiol* 57: 638-642.

**Dellal A et Halitim A., 1992.** Activités microbiologiques en conditions salines.cas de quelques sols sales de la région de relizane (Algérie) *Cah. Agri.vol 1, N°5*, éd John Libbey Euro texte, paris.

**Djebbah F Zohra ,2016,** Isolement des microorganismes (actinomycètes et moisissures) producteurs de substances antimicrobiennes à partir du sol d'une grotte dans la région de Tlemcen (Tagma). Pp 59-60.

**Dommergues Y., et Mangenot F., 1970.** Ecologie microbienne du sol. Masson et Cie Editeurs, paris ,796p.

**Duchaufour P.H., 2001.** Introduction à la science du sol. 6<sup>ème</sup> édition de l'abrégé de pédologie. Dunod. Ed. Masson. Paris. 314p.

**El-Nakeeb M., Lechevalier, H., 1963.** Selective Isolation of Aerobic Actinomycetes. *Appl. Microbiol.* Vol: 11. N°: 2. Pp. 75-77.

**El-Sersy N.A., Abd-Elnaby H., Abou-Elela G.M., Ibrahim H., El-Toukhy N.M.K., 2010.** Optimization, economization and characterization of cellulose produced by marine *Streptomyces ruber*. *Afr. J. Biotechnol* 9: 6355-6364.

**Ensign J.C., 1978.** Formation, properties and germination of actinomycetes spores. *Annu. Rev. Microbiol.* 32, 185-219.

**Ensign J.C., Normand P., Burden J.P. et Yallop C.A., 1993.** Physiology of some actinomycetes genera. *Rev. Microbiol.* 144, 657-660.

**Eunice J.A., et Prosser J.I., 1983.** Mycelial growth and branching of *Streptomyces coelicolor*. A3 (2) on solid medium. *J. gen. Microbial.* **129, 2029-2036.**

**Fan. L, Zheng J., Yang X., 2010.** The effect of natural air-dry time on actinomycetes isolation from sample soil. *Journal of Hainan Medical University.*

**Floyd M. H., pieper R. L., et Mert F. P., 1987.** Sporulation of *Streptomyces roseoporus* insubmerged culture. *J. Ind. Microbiol.* 2 : 235-241.

**Gandhimathi R., Seghal Kiran G., Hema T.A., Selvin J., Rajeetha Raviji T., 2009.** Production and characterization of lipopeptidebiosurfactant by a sponge-associated marine actinomycetes *Nocardiopsis alba* MSA10. *Bioprocess Biosyst Eng* 32: 825-35.

---

- Gazenko S.V., Reponen T.A., Grinshpan S.A., Willeke I.C., 1998.** Analysis of airborne actinomycete spores with flurogenic substrates. *Applied and Environmental Microbiology*. 64:4410-4415.
- Ghanem N.B., Sabry S.A., El-Sherif Z.M., Abu El-Elal G.A., 2000.** Isolation and enumeration of marine actinomycetes from seawater and sediments in Alexandria. *J. Gen Appl Microbiol*, 46(3): 105–111.
- Girard M.C., Walter C., Remy J.C., Berthelin J., et Morel J.L., 2005.** Sols et environnement. Dunod, Paris.
- Gobat J.M., Aragno M., Mathey W., 1998.** Le Sol vivant. Bases de pédologie biologie des sols. Presses Polytechniques et Universitaires Romandes, Lausanne
- Gohel S.D., Singh S.P., 2012.** Purification strategies, characteristics and thermodynamic analysis of a highly thermostable alkaline protease from a salttolerant alkaliphilic actinomycete, *Nocardiopsis alba*. *J. Chromatogr. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci* 889: 61-68.
- Goodfellow M., 2012.** Phylum, Actinobacteria phyl.nov. *In: Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol 5, 2nd edn, The Actinobacteria, Part B. Springer, New York, pp 33–34.
- Goodfellow M., and O'Donnell A.G., 1989.** Search and discovery of industrially significant actinomycetes. *Proceeding of the 44th Symposium on Society for General Microbiology*, Cambridge University Press, Cambridge. pp 343-383.
- Goodfellow M., et Williams S.T., 1983.** Ecology of actinomycete. *Ann. Rev. Microbiol.* 37,189-216.
- Gottlieb D., 1973.** General consideration and implication of the actinomycétales. *In Actinomycetales characteristics and practical importance*. Eds : Sykes G., and Skinner F.A., Academic press, London, New York.
- Gui L.I., Ren L., Gang DUAN 1., Long-Bao L., ZHANG Z., Huang L., and Xun X., 2014.** Isolation and identification of symbiotic bacteria from the skin, mouth, and rectum of wild and captive tree shrews. *Journal zoological research* , 18; 35(6): 492–499.
- Gulve R., and Deshmukh A., 2011.** Enzymatic activity of Actinomycetes isolated from marine sediments. *Recent. Research in Science and Technology*, 3(5): 80-83..
- Habbeche A., Saudi B., Jaouadi B., Haberra S., Kerouaz B., 2014.** Purification and biochemical characterization of a detergent-stable keratinase from a newly thermophilic *Actinomycete actinomadura* keratinilytica strain Cpt29 isolated from poultry compost. *J Biosci Bioeng* 117: 413-421.
-

- Horikoshi K., 1999.** Alkaliphiles: some applications of their products for biotechnology. *Microbiol Mol Biol Rev* 63: 735-750.
- Jacob N., Poorna C.A., Prema P., 2008.** Purification and partial characterization of polygalacturonase from *Streptomyces lydicus*. *Biores. Technol* 99: 6697- 6701
- Janaki T., 2016.** Keratinase activity (Feather) of *Streptomyces cacaoi* sub sp. cacaoi-M20. *Int. Journal of Pharma. Sci and Research*, 1(2); 25-27.
- Janaki T., Nayak B.K., Ganesan T., 2016.** Antifungal activity of soil actinomycetes from the mangrove *Avicennia marina*. *J Med Plants Res* 4: 05-08.
- Jenkinson D.S., & Powlson D.S., 1976.** The effects of biocidal treatments on metabolism in soil. *In "Ecosystèmes et changements globaux". Les dossiers de l'Environnement de l'INRA*, 8 : 81-85.
- Jensen P.R., Dwight R., and Fenica I.W., 1991.** Distribution of actinomycetes in nearshore tropical marine sediments. *Appl Environ Microbiol*, 57(4):1102–1108
- Kar S., Ray R.C., 2008.** Statistical optimization of  $\alpha$ -amylase production by *Streptomyces erumpens* MTCC 7317 cells in calcium alginate beads using response surface methodology. *Pol. J. Microbiol* 57: 49-57.
- Karabi M., 2010.** Fonctionnement microbiologique et biochimique des sols sahariens : étude comparative entre sol salés (palmeraies de l'université d'Ouargla) et sol alluvionnaire (palmeraie traditionnelle de Guerrara). Mémoire magister université Ouargla, 76p.
- Kitouni M., Boudemagh A., Oulmi L., Reghioia S., Boughachiche F., Zerizer H., Hamdiken H., Couble A., Mouniee D., Boulahrouf A., and Boiron P., 2005.** Isolation of actinomycetes producing bioactive substances from water, soil and tree bark samples of the north–east of Algeria. *J Med Mycol*, 15(1) : 45–51.
- Kulkarni N., Gadre R., 2002.** Production and properties of an alkaline, thermophilic lipase from *Pseudomonas fluorescens* NS2W. *J. Ind. Food Microbiol* 28: 344-348.
- Kuster E.,Williams S.T., 1964.** Selection of media for isolation of *Streptomyces*. *Nature*. 202: 928-929.
- Lacey J., 1997.** .Actinomycetes in composts. *Ann. Agr. Env. Med.* 4, 113-121.
- Larpent J.P., et Sanglier J.J., 1989.** Biotechnologie des antibiotiques. Ed. Masson. Paris, 481
- Larpent J.P. et Sanglier J.J., 1989.** .Biotechnologie des antibiotiques. Masson. Paris. 130 pages (31-61).
-

- Lechevalier H.A. et Lechevalier M.P., 1981.** Introduction to the order Actinomycetales. *In* : The procaryotes, Eds : **Starr M.P., Stolp H., Truper H. G., Ballows A., and Schlegel H.G.,** Springer-Verlag. Berlin. 2, 1915-1922.
- Lee. E.J., Hwang K.Y., Lee H.S., & Chung N., 2011.** Characterization of a New *Streptomyces* sp. A1022 as a Potential Biocontrol Agent. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* Vol: 54. N°: 3. Pp:488-493
- Lemriss S., Laurent F., Couble A., Casoli E., Lancelin J.M., Saintpierre-Bonaccio D., Rifali S., Fassouane A., Boiron P., 2003.** Screening of polyenic antifungal metabolites produced by clinical isolates of actinomycetes. *Can. J. Microbiol* 49:669-74.
- Locci R., 1976.** “Developmental micromorphology of actinomycetes”. *In*: Actinomycetes the boundry microorganisms: Arai. TED. Tokyo. 170-180.
- Maameri M., 2007.** Caractérisation microbiologique des sols sous conditions semi-arides. (Ksar Chellala) Mémoire.Ing.Agro.Univ. Ibn-Khaldoun, Tiaret.
- Mariat F. et Sebald M., 1990.** Les actinomycètes. *In* : Bactériologie médicale. Le Minor Edition Médecine-Science. Flammarion. France. 935-949.
- McNeil M.M, Brown J.M., 1994.** The medically important aerobic actinomycètes : epidemiology and Microbiology. *Clin. Microbiology. Rev.* pp 357-417.
- Messaoudi O., 2013.** Contribution à la caractérisation des souche d’actinomycètes productrices de métabolites antibactériens isolées de la sebkha de kenadsa (Bechar ). Mémoire Magister en microbiologie appliquée .pp 32,34, 35,36.
- Michelen V.V., Castillo E.J., 1984.** Production of amylase by *Aspergillus foetidus* on rice flour medium and characterization of enzyme. *J. Appl. bacteriol.* 56(3) : 395-407.
- Mighélez E.M., Hardisson C., and Manzana I.M.B., 2000.** *Streptomyces*: A new model to study cell death. *J. Cell. Biol.* 3: 153–158.
- Morel L., 1989.** Les sols cultivés. Tech et Doc .Lavoisier, paris, 272p.
- Mostafa S.A., and Salama M.S., 1979.** L-asparaginase producing *Streptomyces* from soil of Kuwait. *Zentralbl Bakteriolog Natur wiss.,* , 134(4): 325 - 334.
- Mustin M., 1987.** Le compost, gestion de la matière organique. Editions François Dubusc, Paris.
- Narayana K.J.P et al., 2007.** L-asparaginase production by *Streptomyces albidoflavus*. *Indian J. Microbiol.,* , 48(3): 331-336.
- Ninawe S., Lal R., Kuhad R., 2006 .** Isolation of three xylanase-producing strains of actinomycetes and their identification using molecular methods. *Curr Microbiol* 53: 178-182.
-

- Nonomura H., and Ohara Y., 1969.** The distribution of Actinomycetes in soil. A selective plate-culture isolation method for *Microbispora* and *Streptosporangium* strains. Part I. J. Ferment. Technol. 47: 463–469.
- Ouhdouch Y., Barakate M., Finance C., 2001.** Actinomycetes of Moroccan habitats: Isolation and screening for antifungal activities. Eur. J. Soil. Biol. 37:69-74.32, 34.
- Patke D., and Dey S., 1998.** Proteolytic activity from a thermophilic *Streptomyces megaspores* strain SDP4. Lett. Appl. Microbiol 26, 171-174.
- Paul E.A., & Clark F.E., 1996.** Soil microbiology and biochemistry. 2nd edition. Academic Press. San Diego, California (USA), 340.
- Pierzynski G., J Thomas S. et Vance G., 2005.** Soils and Environmental Quality. CRC Press, Boca Raton (USA).
- Priya B.S., Stalin T., Selvam K., 2012.** Efficient utilization of xylanase and lipase producing thermophilic marine actinomycetes (*Streptomyces albus* and *Streptomyces hygrosopicus*) in the production of alternative energy from waste. Afr J Biotechnol 11: 14320-14325.
- Quénéa K., 2004.** Etude structurale et dynamique des fractions lipidiques et organiques réfractaires de sols d'une chronoséquence forêt/maïs (CESTAS, Sud-ouest de la France). Thèse de Doctorat. Université de Paris 6 (France).
- Rathan R.K., and Ambili M., 2011.** Cellulase enzyme production by *Streptomyces* sp. using fruit waste as substrate. Australian Journal of Basic and Applied Sciences, pp. 1114–1118.
- Raval., 2012.** Biotransformation of a single amino acid L-tyrosine to a bioactive molecule L-DOPA. Int. J. Sci Res, 2: 2250–3153.
- Ravikumar S., Inbaneson S.J., Uthiraselvam M., Priya S.R., Ramu A., and Banerjee M.B., 2011.** Diversity of endophytic *actinomycetes* from Karangkadu mangrove ecosystem and its antibacterial potential against bacterial pathogens. J Pharm Res ; 4 (1): 294-296.
- Reponen T.A., Gazenko S.V., Grinshpun S.A., Willeke K., et Cole E.C., 1998.** Characteristics of airborne actinomycetes spores. Appl. Environm. Microbiol. 64, 3807-3812.
- Roy S., Das I., Munjal M., Karthik L., Kumar G., Kumar S., and Rao K.V.B., 2014.** Isolation and characterization of tyrosinase produced by marine actinobacteria and its application in the removal of phenol from aqueous environment. Front. Biol. 9 (4): 306– 316.
- Saadoun I., Rawashdeh R., Dayeh T., Ababneh Q., and Mahasneh A., 2007.** Isolation, characterization and screening for fiber hydrolytic enzymes-producing *Streptomyces* of Jordanian forest soils. Biotechnology, 6 (1), 120-128.
- Sanglier J.J., et Trujillo M., 1997.** Substances bioactives produites par les actinomycetes et stratégie de sélection de souches. Bull. Soc. Fr. Microbiol. 12, 13.
-

- Benouagueni S., 2014.** recherche de nouvelles souches d'actinomycètes productrices de molécules antifongique (cas des eaux du lac mellah d'el kala), Thèse Doctorat en microbiologie appliquée, université Annaba.
- Sasson A., 1967.** Recherches éco-physiologique sur la flore bactérienne de sol des régions du Maroc. Série botanique et biologie végétale. Travaux de l'institut scientifique chérifien et de faculté des sciences, rabat, N°30: 27-55.
- Sathya R., Ushadevi T., 2014.** Industrially important enzymes producing *Streptomyces* species from mangrove sediments. Int. J. Pharm. Pharm. Sci, **6 (10), 233-237.**
- Sharma D., Kaur T., Chadha B.S., & Manhas R.K., 2011.** Antimicrobial Activity of Actinomycetes Against Multidrug Resistant *Staphylococcus aureus*, *E. coli* and various other pathogens. Tropical Journal of Pharmaceutical Research December. Vol 10. N: 6. Pp: 801-808.
- Shigeri Y., Matsui T., Watanable K., 2009.** Decomposition of intact chicken feathers by a thermophile in combination with an acidulocomposting garbage- treatment process. Biosci. Biotechnol. Biochem 73: 2519- 2521.
- Smaoui S., 2010.** Purification et caractérisation de biomolécules à partir de microorganismes nouvellement isolés et identifiés. Thèse de Doctorat en Génie de Procédés et Environnement. Université de Toulouse. France. 251p.
- Soltner D., 2005.** Les bases de la production végétale. Le sol et son amélioration. Tome I, 24<sup>è</sup>m édition; collection Sciences et techniques agricoles.
- Song J., Weon H.Y., Yoon S.H., Parrk D.S., Suh J.W., 2001.** Phylogenetic diversity of thermophilic actinomycetes and Thermoactinomycetes isolated from mushroom composts in Korea based on 16S rRNA gene sequence analysis. FEMS. Microbiol. Lett, 202(1): 97–102
- Soulas G., Codaccioni P., & Fournier J.C., 1983.** Effect of cross treatment on the subsequent breakdown of 2,4-D, MCPA and 2,4,5-T in the soil. Behaviour of the degrading microbial populations. Chemosphere, 12 (7/8): 1101-1106.
- Srinivasan M.C., Laxman R.S., and Deshpande M.V., 1991.** Physiology and nutrition aspects of actinomycetes – An overview. World Journal of Microbial and Biotechnology 7, 171-184.
- Stamford T.L.M., Stamford N.P., Coelho L.C.B., and Araujo J.M., 2001.** Production and characterization of a thermostable $\alpha$ -amylase from *Nocardiopsis* sp. endophyte of yam bean. Bioresource Technology. Vol.76, N°2, pp. 137–141, 2001.
-

- Tifrit Abd., 2015.** Isolement et caractérisation des bactéries à intérêts biotechnologiques à partir de niches écologiques Algériennes. Thèse Doctorat biologie moléculaire et génomique, université de Chlef.
- Tlas R.M., & Bartha R., 1992.** Microbial ecology fundamentals and applications. 3rd edition. The Benjamin/Cummings Publishing Company. San Francisco, California (USA), 563.
- Verma N., et al., 2007.** L-asparaginase: a promising chemotherapeutic agent. Crit. Rev. Biotechnol., 27(1): 45-62.
- Vonothini G., Murigan M., Sivakumar K., and Sudha S., 2008.** Optimization of protease production by an actinomycete strain, PS-18A isolated from an estuarine shrimp pond. Afr. J. Biotechnol. 7, 3225-3230.
- Wietzorrek A., Bibb M., 1997.** A novel family of proteins that regulates antibiotic production in *Streptomyces* appears to contain an Omp R-like DNA-binding fold. Mol. Microbiol 25: 1181-1184.
- Williams and Cross, 1971.** Isolation, purification, cultivation and preservation of actinomycetes. Methods Microbiol. 4 : 295-334.
- Williams S.T., Locci R., Beswick A., Kurtboke D.I., Kuznetsov V.D., Le Monnier F.J., Long P.F., Maycroft K.A., Palma R A., Petrolini B., Quaroni S., Todd J.I. et West. M., 1993.** Detection and identification of novel actinomycetes. Microbiol. 144, 653- 656.
- Yamamoto S.P, Bouvet J.M., and Harayama S., 1999.** .Phylogenetic structures of the genus *Acinetobacter* based on *gyrB* sequences: comparison with the grouping by DNA-DNA hybridisation. International Journal of Systematic Bacteriology. 49:87-95.
- Zhang F., Chen J.J, Ren W.Z, Nie G.X, Ming H., et al., 2011.** Cloning, expression and characterization of an alkaline thermostable GH9 endoglucanase from *Thermobifidahalotolerans* YIM 90462 T. BioresTechnol 102: 10143-10146.
- Zhou X., Huang J., Wang H., and Wang R., 2000.** Conditions of enzyme production and properties of alkaline lipase by *Streptomyces* Z 94-2. 40, 75–79.
-



## Résumé

Les enzymes d'origine bactériennes représentent une source importante dans les applications industrielles, telles que l'utilisation des amylases dans la biodégradation de l'amidon. L'objectif principal de cette étude est la mise en évidence l'activité enzymatique des extraits d'amylases de ces souches. Dans ce travail, trois souches d'acténobactéries appartenant au genre *Streptomyces sp* ont été isolées à partir du sol de la région de Mostaganem. Morphologiquement, ces isolats sont identifiés et caractérisés par des observations macro et microscopiques, suivi des tests physiologiques et biochimiques. Une fermentation submergée des isolats dans un milieu liquide riche en amylose a été effectuée pour produire les amylases. après l'extraction des fractions enzymatiques solubles, la quantification protéiques et les paramètres cinétique ( $V_i$ ,  $K_m$ ,  $V_{max}$ ) de ces extraits ont été déterminés par les méthodes colorimétriques de Buiret à  $\lambda = 554$  nm et au réactif de Fehling  $\lambda = 600$  nm.

Les résultats des tests physiologique et biochimique sont positifs à l'exception du test nitrate pour la souche S3 qui est négatif. Les caractérisations macro, microscopiques confirment que les trois isolats d'actinobactéries appartiennent au genre *Streptomyces sp*. Les extraits enzymatiques bruts des souches présentent des concentrations 0,033 ; 0,0026 et 0,0025  $\mu\text{mol/l}$  respectivement pour les trois isolats (S3, S2, S1). Le dosage des produits libérés au cours des différentes réactions d'hydrolyses du substrat (amidon) présentent respectivement des valeurs supérieures de S3 et S2  $\mu\text{mol}$  glucose /l pour les isolats S3 et S2. Cependant, les valeurs du  $K_m$ , sont très faibles obtenus respectivement avec les extraits des souches de *Streptomyces sp*. S3, S2 et S1 ( $0,10 \times 10^{-3}$ ,  $0,12 \times 10^{-3}$  et  $0,20 \times 10^{-3}$ ). Les vitesses initiale ( $V_i$ ) des réactions sont de 0,06 et 0,125 et 0,24  $\text{mol. l}^{-1}.\text{min}^{-1}$  respectivement pour les trois isolats (S1, S2, S3).

Les résultats expérimentaux obtenus ouvrent des perspectives positives pour des bonnes exploitations industrielles des souches et leurs enzymes.

**Mots-clés :** *Streptomyces sp*, Amylase, constante  $K_m$  ; Vitesse initiale

## Summary

Enzymes of bacterial origin represent an important source in industrial applications, such as the use of amylase in the biodegradation of starch. The main objective of this study is to demonstrate the enzymatic activity of the amylase extracts of these strains. In this work, three strains of acténobactéries belonging to the genus *Streptomyces sp* were isolated from soil of de Mostaganem region. Morphologically, these isolates are identified and characterized by macro and microscopic observations, followed by physiological and biochemical tests. Submerged fermentation of the isolates in liquid medium rich-starch was performed to produce the amylases after nearly the extraction of soluble enzyme fractions, the protein quantification and kinetic parameters ( $K_m$ ,  $V_{max}$ ,  $V_i$ ) of these extracts were determined by colorimetric methods Buiret and Fehling reagent at  $\lambda = 554\text{nm}$  and  $\lambda = 600\text{nm}$ .

The results of the physiological and biochemical tests are positive with the exception of the nitrate test for the strain S3, which is negative. Macro and microscopic characterizations confirm that the three isolates of actinobacteria belong to the genus *Streptomyces sp*. the enzymes crude extracts of the strains have concentrations of 0,033; 0,0026 and 0,0025  $\mu\text{mol/l}$

Respectively for the three isolates (S3, S2, S1). the dosage of the products released during the different hydrolysis reactions of the substrate (starch) respectively have higher values of S3 and S2  $\mu\text{mole}$  glucose /l for the isolate S1. However, the  $K_m$  values are very low, obtained with the extracts of the strains of *Streptomyces sp*.  $0,10 \times 10^{-3}$ ,  $0,12 \times 10^{-3}$  et  $0,20 \times 10^{-3}$  respectively for S3, S2 and S1. The initial velocities ( $V_i$ ) of the reactions are 0,06; 0,125; 0,24  $\text{mol. l}^{-1}.\text{min}^{-1}$  respectively for the three isolates (S1, S2, S3).

The experimental results open up positive prospects for good industrial operations strains and enzymes.

**Keywords :** *Streptomyces sp*, Amylase,  $K_m$ ,  $V_{max}$ , initial speed  $V_i$ .



