

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^{lle} Benzekhroufa Ahlem

Pour l'obtention du diplôme de

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Spécialité: MICROBIOLOGIE APPLIQUEE

THÈME

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

Soutenu publiquement le 09 /07/2018

DEVANT LE JURY

Président : ABD. CHAALEL	: M.C.A	U. Mostaganem
Encadreur : M ^{lle} F TISSOURAS	: M.C.A	U. Mostaganem
Examinatrice: A.BELARBI	: MCB	U. 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. Maître 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 gratitudees pour ses encouragements, ses conseils et sa disponibilité sans limite, qui ont contribué à ma formation et qui m'ont permis de mener à bien ce travail.

Nos s'incères remerciements vont aux Messieurs :

- *Mr Chaalel enseignant et maître de conférences au département de biologie, de la faculté SNV d'avoir accepté de présider le jury ;*
- *Dr Belarbi 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 contribué de loin ou de près.*

*« Certes, il y'a des travaux pénibles ;
Mais la joie de la réussite n'a-t-elle pas à
Compenser nos douleurs ? »*

Jean de la bruyère

AVANT-PROPOS

DEDICACES

Je remercie ALLAH le Généreux pour m'avoir guidé vers la lumière de la recherche du savoir et de la science.

Je dédie ce modeste travail à :

A La Mémoire De Ma Grande Mère : ZOËRA

Je ne t'oublierai jamais

A MON CHÈRE PÈRE : AISSA

Qui ne cesse constamment de m'entourer de son affectation grandissant, de m'enrichir de son expérience, de me prodiguer ses conseil, et qui ma 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 CHÈRE MÈRE : FATIHA

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 soutien 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

A mes belles sœurs : Zineb, Aiya et Douaa ,a toute membre de ma famille c'est un moment de plaisir de dédier cet œuvre.

A toutes mes coupines : Ahlem, Hadja, Salihha, Samira, Fatima, Djohar pour les bons souvenirs et le beau temps que nous avons passé ensemble, en leur souhaitant le succès et le bonheur dans leurs vie.

A mes connaissances et à tous qui sont chères à mon cœur.

Liste des abréviations

C.SP	: Chaines de spores
CAA	: Caséine amidon agar
CG	: Guanine, cytosine
D.O	: Densité optique
ENDO	: Endo-Amylases
EXO	: Exo-Amylases
MA	: Mycélium aérien
MS	: Mycélium du substrat
RA	: Retinaculum Apertum (chaines en crochets ou en boucles)
RF	: Rectus Flexibilis (chaines de spores droites à flexueuses)
S	: Spira (chaines spiralées)
S	: Sporophore
SG	: Sporangies
SP.I	: Spores isolés
SP.M	: Spores mobiles
VP	: Réactif de Voges-Proskauer
RM	: Réactif Rouge de Méthyle
NR1et 2	: Réactif de Greiss de test Nitrate réductase.
Km	: Constante de Michaelis
Vi	: Vitesse initiale d'oxydation
Vmax	: Vitesse maximale d'oxydation
S1, S2et S3	: les souches de <i>Streptomyces</i> isolées
D.O	: Densité optique

Liste des figures

Figure 1	Apparence d'isolats d'Actinobacteria sur caséine amidon	07
Figure 2	Micromorphologie des principaux genres d'actinobactéries	08
Figure 3	mode d'action de l'alpha-amylase	12
Figure 4	Mécanismes d'action des enzymes amylolytiques	13
Figure 5	Principale voies du métabolisme des protéines	14
Figure 6	Catabolisme des triglycérides	15
Figure 7	Protocole expérimental général	18
Figure 8	Diagramme d'obtention de l'extrait enzymatique des isolats d'actinomycètes.	25
Figure 9	Observations macroscopiques des colonies d'actinobactéries à l'aide d'une loupe binoculaire 4x10	26
Figure 10	Trois souches isolées et purifiées de <i>Streptomyces</i> sélectionnés	31
Figure 11	Test d'hydrolyse d'amidon des trois souches de <i>Streptomyces</i> sp d'actinobactéries	32
Figure 12	Observation direct par la boîte de mycélium aérien au microscope optique (GX 40 et 100)	33
Figure 13	Coloration de Gram des trois souches de <i>Streptomyces</i> sp	33
Figure 14	Résultats des tests d'hydrolyse de la caséine	34
Figure 15	Test positif d'hydrolyse de la gélatine en présence des <i>Streptomyces</i> sp.	35
Figure 16	Test positif d'hydrolyse de la Lécithine en présence des <i>Streptomyces</i> sp	35
Figure 17	Résultats des tests réduction des nitrites pour les souches <i>Streptomyces</i> sp.....	36
Figure 18	Test positif de production d'H ₂ S avec les trois souches <i>Stréptomyces</i> sp...	37
Figure 19	Test Catalase positif des isolats de <i>Streptomyces</i> sp.	37
Figure 20	Tests positifs de dégradation de l'urée en présence des six isolats de <i>Streptomyces</i> sp	38
Figure 21	Test négatif d'utilisation de citrate en présence des trois isolats de <i>Streptomyces</i> sp	38
Figure 22	Tests Négatifs de VP et positifs de RM avec les isolats des <i>Streptomyces</i> sp	39
Figure 23	Courbe de la gamme d'étalonnage de la protéine d'ovalalbumine	39
Figure 24	Concentration des extraits protéiques des trois isolats <i>Streptomyces</i> sp	40

Figure 25	Courbe de la gamme d'étalonnage du sucre réducteur pour le glucose	41
Figure 26	Quantités du glucose libérés après hydrolyse d'amidon obtenu en présence des extraits enzymatiques de <i>Streptomyces</i> sp	41
Figure 27	Cinétiques enzymatique des extraits d'amylases en fonction du temps	42

Liste des tableaux

Tableau 1	Abondance et biomasse des organismes vivants du sol.	02
Tableau 2	Principaux genres d'actinomycètes	06
Tableau 3	Différentes classes d'enzymes.	12
Tableau 4	Propriétés générale des enzymes amylolytiques	13
Tableau 5	Paramètres physico-chimiques des enzymes produites par les actinobactéries	18
Tableau 6	Présentation des résultats de diamètre de la zone d'hydrolyse et l'index d'activité amylolytique des isolats du <i>Streptomyces</i> .	38
Tableau 7	Caractérisations macroscopiques et microscopiques des isolats des <i>Streptomyces</i> sp	39
Tableau 8	Tests physiologiques et biochimiques des isolats d'actinomycète.	41
Tableau 9	Concentration de protéine et sucre réducteurs de l'amylase dans les conditions standards	48

Table des matières

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

Partie 1 : Etude bibliographique

Chapitre I : Les Actinobactéries: taxonomie et classification

1. Définition du sol	02
2. La microflore du sol.	02
2.1. Les algues.	03
2.2. Les protozoaires	03
2.3. Les champignons	03
2.4. Les bactéries.	04
3. Actinobactéries	04
3. Habitats des Actinobactéries	05
4. Classification des actinobactéries	06
5. Critères morphologiques des actinobactérie	06
5.1. Caractères macromorphologiques.	06
5.2. Caractères micromorphologiques.	07
5.2.1. Mycélium de substrat	08
5.2.2. Mycélium aérien	09
5.2.3. Formation et germination des spores	09
6. Mode de reproduction	09
7. Position taxonomique du genre streptomyces	09
8. Rôle d'actinomycètes dans le sol	10

Chapitre 2 : II. Les enzymes d'actinobactéries

II. Les enzymes d'actinobactéries	11
1. Définition des enzymes	11
2. Classification des enzymes	11
2.1. Amylase	12
2.2. Les protéases	13
2.3. Les Lipases	14
2.4. Cellulases	15
2.5. Xylanase	16
2.6. Pectinase	16
3. Caractéristiques des enzymes synthétisées par les actinomycètes	16

Chapitre III : Matériel et Méthodes

V. Matériel et méthodes	18
1. Objectif	18
2. Protocole expérimental général	18
3. Prélèvements des échantillons	19
4. Isolement des actinomycètes (<i>Streptomyces</i>)	19
4.1. Prétraitement des échantillons	19
4.2. Préparation des dilutions	19
4.3. Milieux d'isolement	19
5. Identification des actinobactéries	20
5.1. Aspect morphologiques	20
5.2. Examen microscopique	20
6. Criblage primaire des isolats d'activité amylasique	21
6.1. Test d'activité amylasique	21
6.2. Mesure de la zone d'hydrolyse	21
7. Purification et Conservation des isolats	21
8. La systématique des isolats d'actinomycètes d'activités amylasique choisis	22
8.1. Caractérisation physiologique	22
8.1.1. L'hydrolyse de la caséine	22
8.1.2. La dégradation de l'urée	22
8.2. Caractérisation biochimique	22
8.2.1. L'utilisation de citrate	22

8.2.2. Les réactions VP et RM	23
8.2.3. La réduction de nitrate réductase	23
8.2.4. La production d'H ₂ S	23
8.2.5. La catalase	23
8.2.6. Protéolyse de la gélatine	24
8.2.7. Recherche de lécithinases et lipases	24
9. Production d'amylase par fermentation submergée	24
9.1. Sporulation des souches sélectionnées	25
9.2. Inoculation des milieux de fermentation	26
9.3. La fermentation submergée et extraction de l'enzyme	26
10. Étude de la cinétique des extraits enzymatiques	26
10.1. Dosage colorimétrique par la méthode de Biuret des l'extraits enzymatiques	26
Principe.	
10.2. Etude cinétique des extraits enzymatiques	27
10.2.1. Préparation de la gamme d'étalonnage du glucose	27
10.2.2. La cinétique des extraits enzymatiques	27
Chapitre IV : Résultats et Discussion	
IV. Résultats et discussion	29
1. Isolement et purification des actinobactéries	29
2. Caractérisation des actinobactéries	30
2.1. Etudes morphologique	30
2.2. Criplage primaire.	30
2.3. Aspect microscopique	32
2.6. Coloration de Gram	33
3. Tests physiologiques et biochimiques	34
3.1. Hydrolyse de la caséine	34
3.2. Hydrolyse de la gélatine	35
3.3. Recherche de lécithinases et lipases.	35
3.4. Réduction des nitrates	36
3.4. Production de sulfure d'hydrogène (H ₂ S)	36
3.5. Recherche de Catalase	37
3.6. Dégradation de l'urée	38
3.7. L'utilisation de citrate.	38

3.8. Les réactions de VP et RM	39
4. Production des extraits enzymatiques des isolats <i>Streptomyces sp</i>	39
4.1. Dosage des extraits enzymatiques par la réaction de Biuret	39
4.2. Cinétique des extraits d'amylasiques des isolats <i>Streptomyces sp</i>	40
4.3. Mesure des paramètres cinétiques	42
Conclusion et perspectives	44
Références bibliographiques	45
Annexes	54
Résumé	



Partie I
Etude bibliographique

A decorative border resembling a scroll, with a vertical strip on the left and rounded corners at the top and bottom. The word "Introduction" is centered within this border.

Introduction

Introduction

Les enzymes produites par les micro-organismes sont des biocatalyseurs potentiels des réactions biochimiques. Généralement, les enzymes dérivées d'une source microbienne sont considérées comme des biocatalyseurs robustes, à haute spécificité et rendement économique important. Aujourd'hui, la recherche est beaucoup plus focalisée pour obtenir de nouveaux enzyme et améliorer les caractéristiques fonctionnelles à une large gamme de température, de pH, de salinité ou d'autres conditions extrêmes, par l'ingénierie des gènes et des protéines (**Mukhtar et al.,2017**).

Les actinomycètes sont l'un des groupes les plus divers de micro-organismes qui sont bien caractérisés et reconnus pour leur capacité de produire une grande variété d'antibiotiques et d'enzymes extracellulaires. D'autre part, elles présentent une source importante d'autres métabolites comme la cellulose, la chitine et la pectine qui jouent un rôle important dans le cycle du carbone et aident à maintenir la structure du sol. La production des antibiotiques, des régulateurs de croissance des plantes, des vitamines et des enzymes des actinomycètes représentent une grande partie de la communauté microbienne de la rhizosphère qui sont impliqués dans le renouvellement de la matière organique et l'équilibre de l'écosystème (**Galatenko et Terekhova, 1990 ; Miyadoh, 1997 ; Strobel et al., 2004 ; Cao et al., 2009**).

Parmi les actinomycètes, environ 7600 composés sont produits par les espèces *Streptomyces*. Ce sont un groupe d'organismes unicellulaires ramifiés, elles sont considérées comme des bactéries filamenteuses supérieures. Les actinomycètes constituent une part considérable de la population du sol. Ce sont des bactéries filamenteuses et ramifiées avec une morphologie fongique (**Woznicka, 1964**).

Différents genres d'actinomycètes ont été rapportés comme producteurs des enzymes industrielles potentielles telles que les pectinases, les cellulases, les protéases, les chitinases, les xylanases et les amylases. Ces enzymes sont très utilisées dans les applications biotechnologiques et les domaines biomédicaux en particulier, dans ce contexte le présent travail est focalisé. Ce mémoire présente une synthèse bibliographique qui résume la production des enzymes par Actinomycètes.

Enfin, une partie expérimentale regroupant la présentation des résultats et la discussion, suivies d'une conclusion générale et des perspectives.



Chapitre I
Actinobactéries Taxonomie et
Classification

1. Définition du sol

Le sol est un milieu vivant qui assure de nombreuses fonctions environnementales, il représente aussi un réacteur biologique, qui maintient le développement des êtres vivants (Noomene, 2011). C'est un milieu poreux, contenant une phase liquide et une phase gazeuse susceptible de se déplacer et donc de donner le lieu à des flux de matière. C'est un milieu variable dans l'espace : dont la composition et les caractéristiques présentent un double variabilité, à la fois spatiale et temporelle. La variabilité spatiale du sol se manifeste dans les trois dimensions de l'espace. Elle se traduit verticalement par la présence de couches plus ou moins épaisses, appelées «horizons », et latéralement par l'existence de sols différents (Raoul.C, 2013).

2. La microflore du sol

Le sol constitué l'habitat abritant la plus grande diversité d'organismes vivants. Plusieurs milliers d'espèces animales et de microorganismes vivent dans les sols, depuis les microorganismes invisibles à l'œil nu, tel que les bactéries et les protozoaires, jusqu'à la macrofaune : vers de terre, taupes (Henri *et al.*, 1969). Les microorganismes (Actinomycètes, bactéries, champignons, algues unicellulaire), qui peuvent représenter jusqu'à 90% en masse des organismes vivants dans le sol, sont impliqués dans la plupart des fonctions clés du sol (Henri *et al.*, 1969; Laëtitia *et al.*, 2008 ; Eranga, 2015). Leurs nombre et biomasse dans le sol dépassent souvent l'imagination (Tab.1).

Tableau 1 : Abondance et biomasse des organismes vivants du sol (Patricia, 2015).

Organismes	Nombre approximatif		Biomasse moyenne	
	Par gramme de sol sec	Par m ²	En kg/ha prof.20cm	En%(sans Racines)
Bactéries	10 ⁸ - 10 ²⁰	10 ¹³ - 10 ¹⁵	1500	25
Champignons	n.d	n.d	3500	59
Algues	1000 - 10 ³	10 ⁸ - 10 ⁹	10 - 1000	Traces
Protozoaires	10 ⁴ - 10 ⁶	10 ⁹ 10 ¹¹	250	4
Faune du sol selon les groupes (sans protozoaires)	0,1-1000	10 ⁵ - 10 ⁶	15000	12
Racines	n.d	n.d	6000	
Total	n.d	n.d	Env. 12000	100
n.d : non déterminable ; Env : Environ				

2.1. Les algues

Elles constituent un groupe hétérogène d'organismes, selon leurs tailles, leurs habitats et leurs modes de reproduction. Leurs dimensions varient depuis la forme unicellulaire microscopique jusqu'aux formes filamenteuses atteignant un mètre de longueur. Ce sont essentiellement des organismes aquatiques que l'on rencontre dans les eaux douces des lacs, des rivières, des étangs et dans les eaux salines des mers et des océans.

On trouve également en grand nombre dans les sols humides. Elles sont toutes caractérisées par leur photosynthèse, c'est-à-dire leur aptitude à utiliser la lumière comme source d'énergie **(Henri, 1969 ; Xavier et Laurence, 1997)**.

2.2. Les protozoaires

Ce sont des premières formes animales et surtout les moins évoluées. Organismes extrêmement divers dans leur morphologie, leurs dimensions, dans leur structure et leurs fonctions. Ils sont considérés comme des formes dérivées de certaines espèces d'algues unicellulaires qui auraient perdu leur pouvoir de photosynthèse. Elles sont caractérisées par leur forme unicellulaire et la mobilité de la plupart d'entre eux **(Dommergues et Mangenot, 1970)**. Leur distribution est large dans la nature, les formes les plus nombreuses sont aquatiques, d'autres végètent dans le sol et d'autres peuvent se développer sur un autre organisme vivant. Ce sont donc des parasites qui peuvent être soit utiles (symbiose), soit nuisibles, soit indifférents à l'hôte qui les héberge **(Henri, 1969)**.

2.3. Les champignons

Ils sont caractérisés par une structure mycélienne et une organisation cénocytique. Ils sont constitués en effet par des éléments filamenteux, les hyphes, plus ou moins allongés, ramifiés, dont l'ensemble connu sous le nom de mycelium qui peut atteindre plusieurs mètres de longueur. Ces filaments sont en réalité de véritables tubes, résistants et protecteurs, composés principalement de chitine **(Xavier et Laurence, 1997)**. A l'intérieur de ces enveloppes se trouve enfermée une masse cytoplasmique mobile contenant de nombreux noyaux, cette organisation est dite cénocytique.

C'est en basant sur ces modes de reproduction qu'on peut grouper les champignons en quatre classes principales : les phycomycètes, les Ascomycètes, les Basidiomycètes, les Deutéromycètes **(Henri, 1969; Dommergues et Mangenot.F, 1970)**.

2.4. Les bactéries

Ce sont des procaryotes unicellulaire de formes très diverses leur taille peuvent varier entre 1 et 2 μm (Xavier et Laurence, 1997 ; Jaune Michel, 2011), qui peuvent avoir plusieurs formes : cylindrique, sphérique et spirille. Les bactéries vivent dans tout type de sol, avec une préférence pour les sols riches (Xavier et Laurence, 1997)

3. Les Actinobactéries

On peut définir les Actinobactéries comme des Eubactéries Gram positives à structure végétative de type de mycélien (Stanier *et al.*, 1966 in Dommergues et Mangenot, 1970 ; Pandey *et al.*, 2004 ; Rosilma *et al.*, 2016) Les actinobactéries sont l'un des phylums dominants de la bactérie, présentent un groupe à une teneur élevée en guanine et en cytosine (GC = 55%) (Ventura *et al.*, 2007 ; Hogan, 2010). Ils font partie de la flore microbienne de la plupart des substrats naturels (Hotam *et al.*, 2013).

Le mot « Actinomycètes » c'est l'ancien nom des actinobactéries provient de deux substantifs grecs et signifie « Champignons à rayons » ou « Champignons rayonnants ». Cette expression utilisée pour les désigner en anglais (*Ray fung*), ce terme rassemble un grand groupe de bactéries dont la croissance donne lieu à des colonies constituées d'hyphe, c'est-à-dire, des filaments à croissance centrifuge (Stackebrandt et Schumann, 2006 in Toumatia, 2015).

La famille des actinobactéries est constituée d'une quarantaine de genres qui se distinguent les uns des autres essentiellement sur base de leur morphologie générale qui peut être extrêmement diversifiée, comme par exemple le bacille de Koch (*Mycobactérie tuberculos*) et les bactéries filamenteuses appartenant aux genres *Nocardia* et *Streptomyces*. Ils peuvent être terrestres ou aquatiques (Badis *et al.*, 2006; Servin *et al.*, 2008; Ranjani Anandan *et al.*, 2016).

Ces microorganismes, en effet, présentent des similitudes à la fois avec les Eubactéries et avec les champignons (Lakshmipathy et Krishnan, 2016; Janaki, 2017). Les actinobactéries constituent une partie importante de la microflore tellurique (Dommergues et Mangenot, 1970). Ils colonisent des milieux très divers, à cause de leur adaptation et leur résistance a certaines conditions très hostiles (Sudhanshu *et al.*, 2011).

Il existe d'ailleurs toute une série de formes de transition entre les formes mycéliennes typiques et les formes unicellulaires présentant une aptitude peu marquée à former un mycélium ramifié (Ripert., 2013). D'après Alexander,(1961) in Dommergues et Mangenot, 1970 les quatre caractères qui rapprochent les Actinomycètes des Champignons sont les suivants

1. Structure mycélienne présentant des ramifications chez les Actinomycètes typiques, avec une différence des filaments qui ont un diamètre deux fois plus faible (0,5 à 1,2µm) que ceux des champignons, d'où le terme de pseudomycélium employé pour désigner cette structure (**Revot, 1961**) ;
2. Formation fréquente d'un mycélium aérien et de conidies ;
3. En culture, absence de la turbidité caractéristique des bactéries unicellulaire et apparition d'amas de cellules (**Dommergues et Mangenot, 1970**).

D'autre part, il existe des caractères qui rapprochent encore les Actinomycètes et les bactéries, tels que (**Eranga, 2015**) :

1. La morphologie d'allure bactérienne des éléments qui se fragmentent chez les genres subissant une segmentation ;
2. La morphologie typiquement bactérienne chez les formes simples (Mycobactériacées) ;
3. La sensibilité aux attaques virales.

En général, les Actinobactéries sont des hétérotrophes utilisant des molécules organiques préfabriquées, mais plusieurs espèces sont capables aussi de croissance chimio-autotrophique utilisant l'oxydation de l'hydrogène comme source d'énergie et le gaz carbonique comme source de carbone. Cette chimio-autotrophie facultative n'est pas limitée aux Actinomycètes mais se rencontre également chez de nombreux groupes de bactéries (**Elhitti,2017**).

3. Habitats des Actinobactéries

Les actinobactéries ont une distribution très large dans la nature : sol, l'air, les eaux douces, les eaux de mer, les composts, les débris végétaux, le pollen, les abeilles mellifères, les plantes (endophytes), les lichens et plusieurs autres substrats (**Henri, 1969; Goodfellow et Williams, 1983**).

Le sol demeure l'habitat le plus important des actinomycètes, elles sont généralement moins nombreuses que les autres bactéries, leur nombre en terme de propagation est plus important que celui des champignons, avec une densité qui varie entre 10^6 et 10^9 par gramme de sol (**Goodfellow et Williams, 1983 ; Theilleux, 1994**).

Plusieurs rapports montrent la répartition des actinobactéries dans divers endroits, tels que les sols sableux, les sols alcalins noirs, les sols sablo-limoneux, sol à désert alcalin, où *Streptomyces sp* étaient dominants, suivis des autres organismes, tels que *Nocardia*, *Nocardiopsis* (**Ranjani et al., 2016**).

4. Classification des actinobactéries

La classification traditionnelle, qui ne comportait que 4 grandes familles à été profondément remaniée par des approches nouvelle ; étude des constituants cellulaires, bases de l'ADN, taxonomie numérique, sensibilité, aux actinophages, etc (**Tab. 1**) (**Dommergues et Mangenot, 1970 ; Ranjani et al., 2016**).

Actuellement, on compte, dans l'ordre des Actinomycétales, plus de trentaine de genre tels que : *Mycobactériacées*, *Actinomycétacées* (ou *Proactinomycètes*), *Streptomycétacées*, *Actinoplanacées* (**Henri, 1969**).

Tableau 2 : Principaux genres d'actinomycètes (**Stanier et al., 1966 in Dommergues., Mangenot.,1970**).

Familles	Genres	Développement Mycélien	Mode De Reproduction	Acido-résistance	Autres Caractères
Mycobactériacées	<i>Mycobacterium</i>	Transitoire Limité	Scission binaire	+	
Actinomycétacées (Proactinomycètes)	<i>Nocardia</i>	Extensif	Fragmentation massive des hyphes	+ -	Aérobies
	<i>Actinomyces</i>	Extensif	Fragmentation massive des hyphes	-	Anaérobies
Streptomycétacées	<i>Streptomyces</i>	Extensif	Conidies	-	Conidies isolées ou en groupe
	<i>Micromonospora</i>	Extensif	Conidies	-	Conidies isolées ou en groupe
Actinoplanacées	<i>Actinoplanes</i>	Extensif	Sporangio-spoires mobiles	-	Formation de sporange

5. Critères morphologiques des actinobactéries

5.1. Caractères macromorphologiques

Les caractéristiques culturelles des actinobactéries sont déterminées sur différents milieux de culture. Il s'agit d'observer, à l'œil nu, la production ou non du mycélium aérien (MA) et la présence ou non de mycélium du substrat (MS), ainsi que la production ou non de pigments mélanoïdes. Les couleurs du MA, du MS et de celle des pigments diffusibles (en cas de production) sont déterminées à l'aide d'une charte de couleur (**Kelly et Judd, 1976**).

Le mycélium de substrat est dénommé mycélium primaire ou mycélium végétatif varie en taille, en forme et en épaisseur (**fig. 1b**). Sa couleur varie du blanc ou pratiquement incolore

au jaune, brun, rouge, rose, orange, vert ou noir (Ranjani Anandan, 2016). Sur le mycélium primaire (MS) va se développer un mycélium secondaire aérien (Ait Barka *et al.*, 2016).

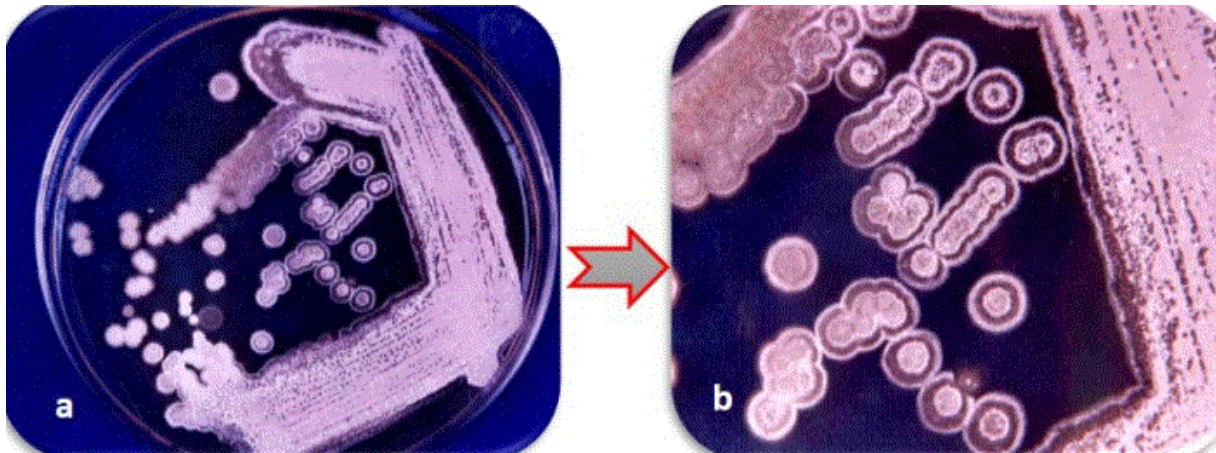


Figure 1. Apparence d'isolats d'Actinobacteria sur caséine amidon (Eranga., 2015)

A : Vue en plan des isolats actinobactériens.

B : Morphologie des colonies individuelles.

5.2. Caractères micromorphologiques

Les caractères micromorphologiques sont déterminés par l'observation directe au microscope optique ou électronique des cultures poussant sur les milieux gélosés (Tresner *et al.*, 1961; Holt *et al.*, 1994). Le MA peut être fragmenté ou sporulant. Les spores sont généralement non mobiles ou parfois mobiles, isolées ou regroupées par deux, par quatre ou en chaînes plus ou moins longues (fig. 2).

Les spores peuvent être sessiles ou portées par des sporophores courts ou longs ou encore formées anarchiquement sur le MA. Quelques genres d'actinobactéries possèdent des structures particulières, comme les sporanges, les sclérotés ou les synnemata (fig. 2).

Le MS peut être stérile ou non, fragmenté ou persistant. Il peut produire ou non des spores (mobiles ou non) ou des sporanges.

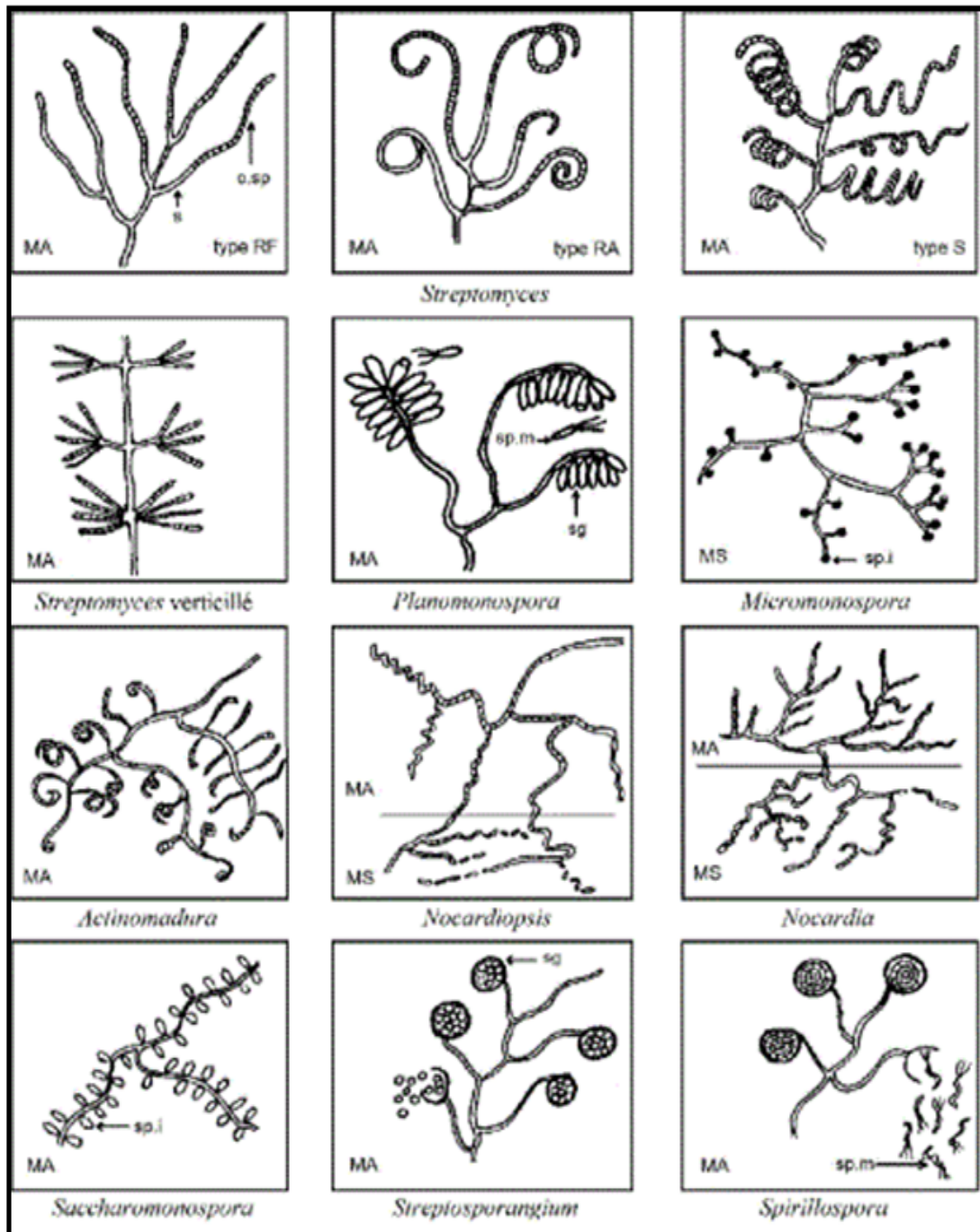


Figure 2 : Micromorphologie des principaux genres d'actinobactéries (Sabaou, 1988).

MA : Mycélium aérien; MS : Mycélium du substrat; RF : *Rectus Flexibilis* (chaînes de spores droites à flexueuses); RA, *Retinaculum Apertum* (chaînes en crochets ou en boucles); S, *Spira* (chaînes spiralées); s, sporophore; c.sp., chaînes de spores; sp.i., spores isolés; sp.m., spores mobiles; sg, sporanges

5.2.1. Mycélium de substrat

Le tube de germination (germination de spore) va croître et donner des hyphes qui se ramifient intensément pénètrent dans le milieu ou se propagent à sa surface. Ce mycélium se développe sur et dans le substrat. Éventuellement pigmenté, il forme des parois transversales

isolant les zones les plus âgées. Il peut se fragmenter chez les bactéries du genre *Nocardioformes* (**Rioseras et al.,2014 ; Ait.B et al., 2016**).

5.2.2. Mycélium aérien

Ce mycélium est généralement plus épais que le mycélium substrat (**fig. 1a**). Il comporte des hyphes peu ramifiés et pourvues d'une enveloppe hydrophobe, ils sont plus épaisses que les hyphes primaires, généralement pigmenté (gris, vert, rouge...) et forme des spores.

Le mycélium aérien montre une différenciation suffisante pour qu'un assortiment divers d'isolats puisse être séparé en un certain nombre de groupes ayant des caractéristiques morphologiques similaires dans des conditions constantes. Ceci est désigné comme l'un des critères les plus importants pour la classification du genre *Streptomyces*, comprenant une structure (cotonneuse, veloutée ou pulvérulente), la formation d'anneaux et la pigmentation (**Ranjani et al., 2016**).

5.2.3. Formation et germination des spores

Des spores peuvent être formés sur le substrat et / ou le mycélium aérien sous la forme de cellules individuelles ou de chaînes de longueurs différentes, c'est une séquence de changements morphologiques de la spore en structure végétative. Quatre étapes distinctes sont décrites : l'activation. L'initiation. «L'émergence du tube germinatif et enfin la croissance.

Les spores formées par les actinomycètes appartiennent à deux groupes : endogènes et exogènes, selon le mode de leur formation (**Ait.B et al.,2016**).

6. Mode de reproduction

La reproduction des actinobactéries peut s'opérer suivant trois modes (**Dommergues., Mangenot, 1970; Ait.B et al., 2016**) :

- Fragmentation pseudobactérienne(fragmentation de mycelium) ;
- Production de conidies (cellule reproductives sphériques ou ovoïdes résultant de la division d'extrémités hyphales) ;
- Production de sporanges (structures en forme de sacs renfermant les spores).

7. Position taxonomique du genre *Streptomyces*

Le genre *Streptomyces* fait partie de la classe des *Actinobacteria*. Il a été très longtemps inclus dans l'ordre des *Actinomycetales* (**Bergey's Manual, 2004**). Les espèces appartenant au genre *Streptomyces* constituent la grande majorité de la famille des *Streptomycetaceae*. Ce genre représentent non seulement une composante prédominante de la population microbienne des sols à travers le monde, mais est aussi considéré comme le groupe d'espèces le plus répandu dans l'environnement (**Eckwall et Schottel, 1997; Labeda et al., 2012 in Toumatia ,2015**).

Morphologiquement, les espèces appartenant au genre *Streptomyces* possèdent un mycélium du substrat abondamment ramifié, généralement non sporulé, surmonté par un mycélium aérien produisant des sporophores qui donnent naissance à des chaînes de spores (jusqu'à 50 spores ou plus par chaîne) de formes variées: droites (*Rectus Flexibilis*: type RF), incurvées ou en boucles (*Retinaculum Apertum*: type RA), spiralées (*Spira*: type S) ou parfois même verticillées (**Fig 2**). Les spores ne sont pas mobiles et ont une surface lisse, rugueuse, épineuse ou chevelue. Les *Streptomyces* possèdent un taux de G+C compris entre 68 et 78% (**Bergey's, 2004 in Toumatia, 2015**).

8. Rôle d'actinomycètes dans le sol

Dans le sol, la densité des Actinomycètes (essentiellement les genres *Nocardia* et *Streptomyces*) est en général de 3 à 15 fois plus faible que celle des bactéries (par exemple **Dommergues et Duchaufour, 1966**); en valeur absolue, elle oscille entre 10^5 et 10^8 unités par g de sol. Cette densité montre une tendance nette à s'élever dans les sols alcalins et à décroître dans les sols submergés. La pondération des actinomycètes explique leur très grande extension : ils sont présents sous tous les climats et sur tous les types de résidus.

Pendant longtemps, il a été considéré que leur rôle dans le sol était négligeable, à cause de leur faible pouvoir compétitif. Aujourd'hui, il semble que leur action soit importante en raison de leur double aptitude telles que :

A. Aptitude à dégrader les substances organiques non biodégradables par les champignons et les Bactéries : En raison de leur aptitude à dégrader la chitine, de très nombreux Actinomycètes seraient capables de décomposer les membranes des Champignons et pourraient ainsi poursuivre la dégradation de la matière organiques entreprise par la microflore (**Dommergues et Mangenot, 1970**).

B. Aptitude à produire des substances probiotiques, antibiotiques ou toxiques : Parmi les substances probiotiques produites par les Actinomycètes, **Krasilnikov (1958)**, a cité : les Vitamines B₁, B₂, B₆, B₁₂, la biotine, l'acide folique. La synthèse des antibiotiques est largement répandue chez les Actinomycètes (50 à 75% des souches isolées sont productrices d'antibiotiques, dont la streptomycine, la chlortétracycline, l'oxytétracycline, la cycloheximide). Certaines espèces synthétiseraient des substances toxiques pour les plantes ou, au contraire, stimulant leur croissance. Les Actinomycètes sont à l'origine de très nombreuses transformations chimiques enzymatiques, elles participent aux cycles biogéochimiques des éléments chimiques tels que les cycles de C, N, S etc (**Dommergues et Duchaufour, 1966 ; Raoul Calvet., 2013**).



Chapitre II
Enzymes d'actinobactéries

II. Les enzymes d'actinobactéries

1. Définition des enzymes

Les enzymes sont des protéines qui exercent une activité catalytique spécifique d'un très grand nombre de réactions chimiques (Navarre et Françoise, 2010). Les principaux facteurs du milieu qui contrôlent la fonction des enzymes sont la température, le pH et l'activité de l'eau etc. En générale, leur activité croît de manière exponentielle avec l'élévation de la température du milieu réactionnel jusqu'aux environ de 60-70°C, au-delà de cet intervalle, elles perdent leur activité. Leurs pH optimum varient avec la nature des enzymes et des réactions. Le plus souvent est compris entre 4 et 9 (Pierre, 2000).

Les micro-organismes qui vivent dans le sol ne peuvent pas transporter des molécules complexes à l'intérieur de leurs cytoplasmes. Ils synthétisent des enzymes extracellulaires pour décomposer ces molécules en nutriments utiles et essentiels.

Les enzymes provenant de micro-organismes sont des bio-catalyseurs et sont, après les antibiotiques les plus importants produits des actinobactéries. Ils constituent d'excellentes sources de substances bioactives, car ces dernières possèdent une capacité hydrolytique extracellulaire qui a des applications dans les industries, de textile, des bio-raffineries, d'agroalimentaires, les papèteries et pharmaceutiques (Janaki., 2010).

2. Classification des enzymes

Les enzymes sont classent en fonction des réactions qu'elles catalysent, on distingue six familles (tab3)

Tableau 3: Différentes classes d'enzyme (Pierre Feillet., 2000).

Classe	Réactions catalysées
EC 1 Oxydo-réductases	Oxydo-réduction (transfert d'oxygène)
EC 2 Transférases	Transfert de groupes fonctionnels
EC 3 Hydrolases	Coupure une molécule avec fixation d'eau (hydrolyse)
EC 4 Lyases	Coupure autre que l'hydrolyse
EC 5 Isoméras	Remaniement interne d'une molécule
EC 6 Ligases	Synthèses de nouvelles molécules par addition d'éléments

2.1. Amylase

Les amylases sont des enzymes capable d'hydrolyser les molécules d'amidon en une variété de produits comprenant des **dextrines** et des **polymères** composés de plus petits d'unités de glucose qui donne un sirops riches en fructose, en glucose et en maltose (**fig3**).

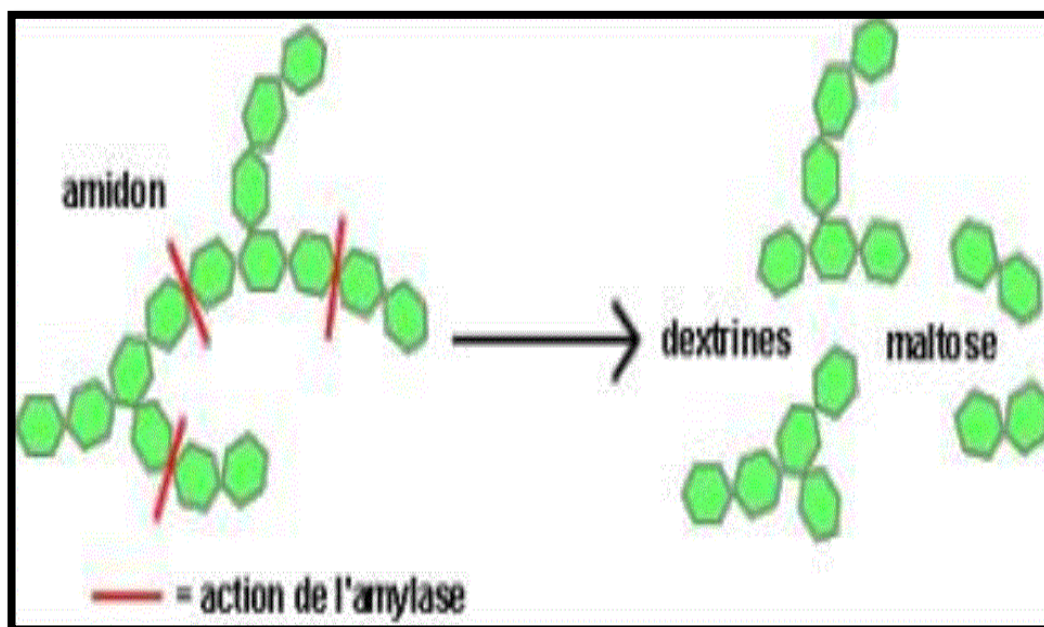


Figure 3 : Mode d'action de l'alpha-amylase (Florimont, 2013 in Meziani et Mahcene, 2017)

Les actinobactéries telles que les *Streptomyces erumpens* et les *Thermobifidafusca* sécrètent des amylases à l'extérieur des cellules pour effectuer une digestion extracellulaire (Kar et Ray, 2008; Janaki, 2017). Il existe différents types d'amylases, on distingue les alpha-amylases produites par les *Nocardiosis* sp (William et al., 2012), les bêta-amylases sécrétées par les *Streptomyces* sp (Christoph Wittmann et al., 2017), les pullulanases et les amyloglucosidases (Tab, fig 4).

Tableau 4 : Propriétés générales des enzymes amylolytiques (Pierre, 2000).

Enzymes	Liaison	Mode d'action	Produits de fin de réaction
Alpha-amylase	Alpha-(1,4)	Endo	Glucose, maltose, oligosides
Beta-amylase	Alpha-(1,4)	Exo	Maltose, dextrines
Pullulanases	Alpha-(1,6)	Endo	Chaîne linéaire d'anhydroglucose
Amyloglucosidases	Alpha-(1,4) et (1,6)	Exo	Glucose
⁽¹⁾ Endo-ou exo-amylases			

Les amylases se différencient par leur aptitude à couper les liaisons glycosidiques alpha 1,4 ou alpha 1,6 par leur mode d'action au hasard à l'intérieur de la chaîne d'unités de glucosyles (endo-enzymes) ou à partir des extrémités non réductrices (exo-enzymes) (**fig 4**) (**Pierre, 2000 ; Ragunathan et Padhmadras, 2013**).

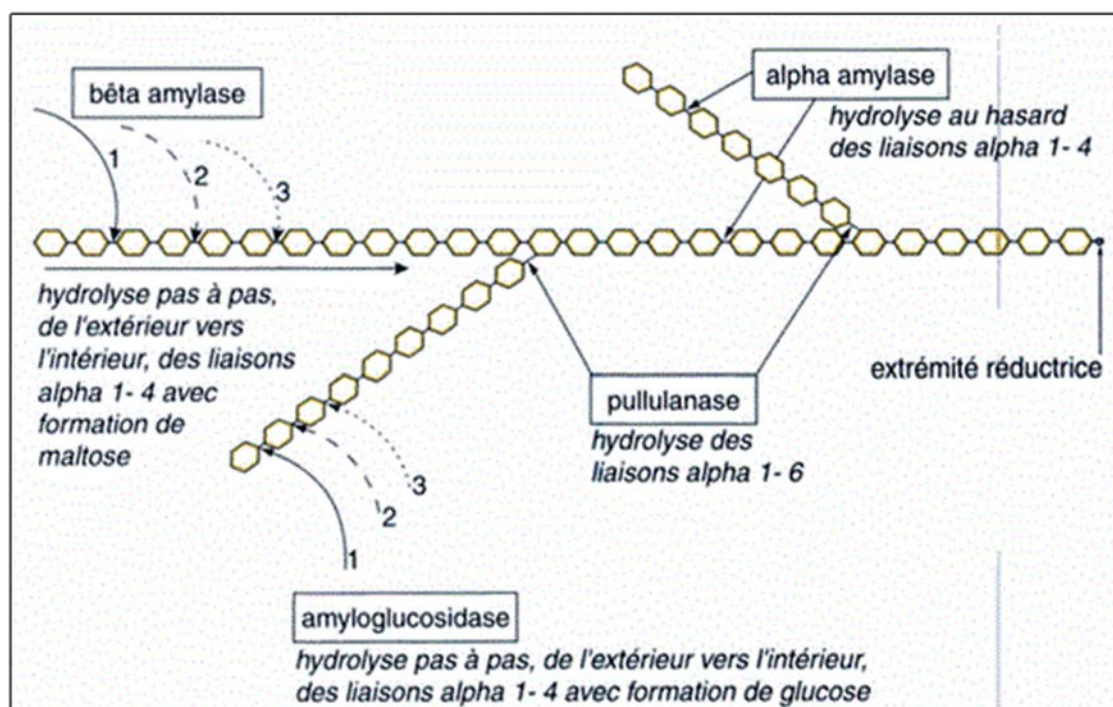


Figure 4 : Mécanismes d'action des enzymes amyolytiques (**Pierre Feillet., 2000**).

Ces enzymes amyolytiques sont capables d'hydrolyser l'amidon (amylose et amylopectine) et ses produits de dégradation sont dextrine, oligosaccharides. Les amylases jouent un rôle majeur dans les applications biotechnologiques telles que l'industrie alimentaire, la fermentation et le textile. Dans l'industrie papetière environ 25% des amylases sont demandées sur le marché mondial des enzymes. Les amylases peuvent provenir de plantes, d'animaux et de microbes. Les enzymes d'origine microbienne répondent généralement à une forte demande dans les industries (**Janaki., 2017**).

2.2. Les protéases

Les enzymes protéolytiques ou protéases sont des enzymes qui catalysent l'hydrolyse des protéines (**Michel, 2013**). Ce groupe d'enzymes favorise l'hydrolyse des liaisons peptidiques entre deux acides aminés. Les protéases dépolymérisent les peptides et les protéines en libérant des acides aminés de plus petits peptides (**Fig 5**) (**Navarre, 2010; Jean-Claude et al., 2014**).

Les streptomycètes sont reconnus comme les importants sécréteurs de protéases. En effet, plusieurs bactéries du genre *Streptomyces* : *S. clavuligerus*, *S. griseus*, *S. rimouses*, *S. thermoviolaceus* secrètent une multitude de protéases dans leurs milieux de culture. Les *S. moderatus* et *S. griseus*, synthétisent au moins 5 protéases différentes dans le surnageant de culture. D'autres travaux ont montré que parmi plus de 500 souches de *Streptomyces* étudiées ont une activité protéolytique et les protéases des *S. fradiae* présentent le plus haut niveau d'activité provenait (Ghorbel, 2014 ; Boulahrouf, 2017).

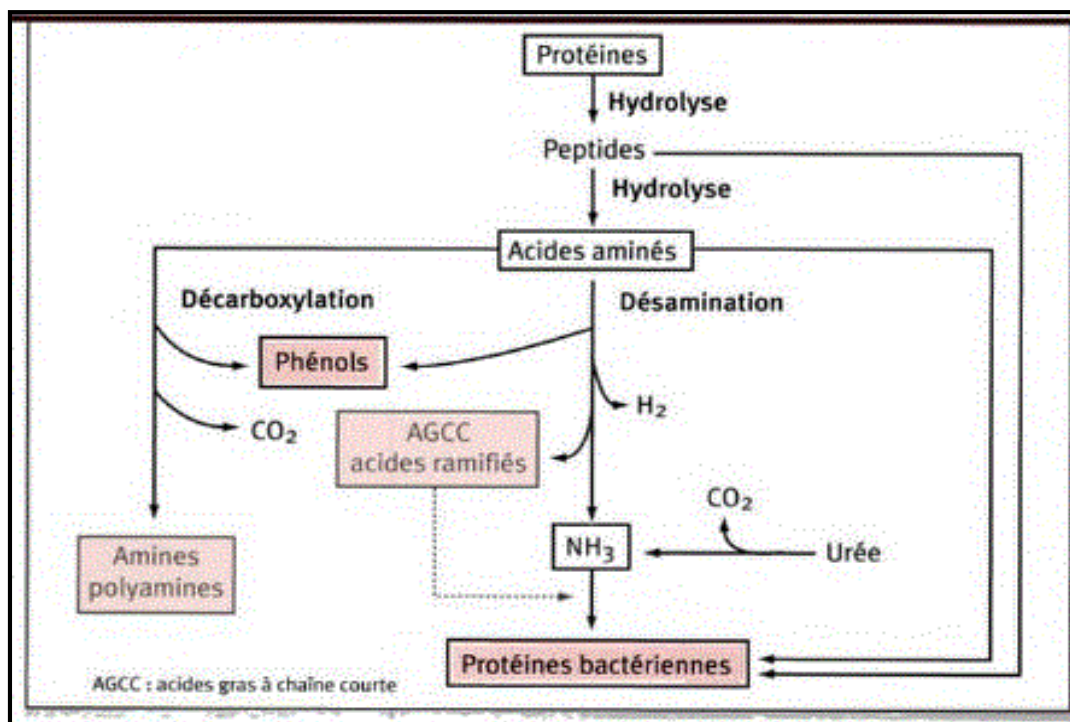


Figure 5 : Principale voies du métabolisme des protéines (Gean Claud *et al.*, 2004).

Les protéases sont parmi les classes les plus importantes industriellement telles que dans la fabrication des détergents, des lessives, la préparation de cuir, la laiterie, la panification et les applications médicales et pharmaceutiques. Elles constituent plus de 65% des demandes totales des industries (Boulahrouf., 2017).

2.3. Les Lipases

Les triacylglycérol-hydrolases ou les lipases sont des enzymes atypiques vu leurs mécanismes d'action et leurs spécificités de substrats. Selon le milieu réactionnel de l'enzyme, elles peuvent agir en tant qu'hydrolases en milieu aqueux ou comme catalyseurs en synthèse organique (fig 6) (Mukhtar *et al.*, 2017).

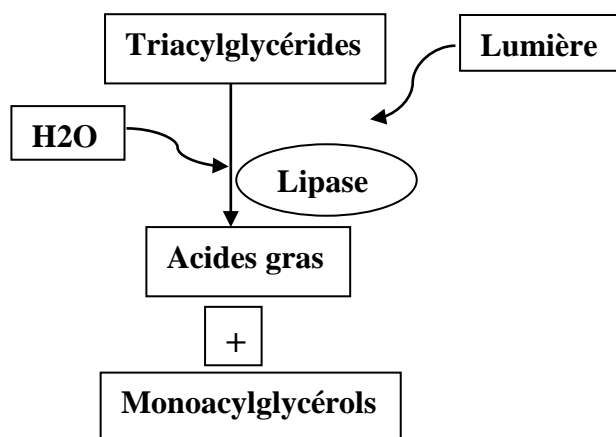


Figure 6 : Catabolisme des triglycérides (Mukhtar *et al.*, 2017).

Les lipases forment une famille hétérogène d'enzymes et constituent une classe particulière d'estérases (Fickers *et al.*, 2008). Les lipases sont largement répandues chez les bactéries, les levures et les champignons filamenteux et les actinomycètes chez *Streptomyces rimosus*, *Rhodococcus* ; *Nocardia erythropolis* ; *Streptomyces exfoliates* et *Nocardiopsis alba* produisent des lipases qui hydrolysent les liaisons ester des triglycérides en glycérol et en acides gras respectivement selon les auteurs (Gerard Meurant *et al.*, 1988; Maheshwari, 2015).

Les lipases microbiennes présentent plus d'avantages comme les procédés de fabrication très simples et une grande stabilité vis-à-vis la température, les détergents et les enzymes protéolytiques comparés aux lipases d'origine animale. Les lipases peuvent être utilisées dans le traitement des huiles et des graisses, des cosmétiques, des diagnostics et des détergents. Ces caractéristiques ont permis le développement de nombreuses applications pour les lipases microbiennes qui ont abouti à de nombreux produits commerciaux dont elles présentent une classe importante d'enzymes industrielles d'intérêt récent dans la recherche fondamentale et appliquée (Patrick *et al.*,2008; Geraldine *et al.*,2009).

2.4. Cellulases

Les cellulases sont des enzymes qui convertissent la cellulose en glucose et d'autres produits chimiques de base. D'après (Rajeeva et SoniTiwari., 2015 ; Tanveer *et al.*,2014; Hitesh *et al.*, 2016) 3 types d'enzymes de cellulase agissent en synergie.

Les cellulases sont des enzymes inductibles synthétisées par une grande diversité de microorganismes comprenant à la fois des champignons, les bactéries et les actinobactéries au cours de leur croissance sur la matière cellulosique (Ramesh *et al.*2015). Actuellement, les cellulases sont utilisées dans l'industrie alimentaire, la brasserie, l'alimentation animale, le

textile et la blanchisserie, les pâtes papiers, ainsi que dans l'agriculture et dans la recherche (Bhat., 2000).

2.5. Xylanase

Les xylanases sont des glycosidases) qui catalysent les liaisons 1,4-D-xylosidiques dans les régions non substituées des chaînes de xylanes pour aboutir à la xylose (Gerois., 2008).

Elles constituent un complexe multi-enzymatique (Larreta-Garde., 1997), ils sont aussi secrétées par de nombreux champignons (pathogènes et saprophytes), par des bactéries marines et telluriques ainsi que par les micro-organismes du rumen (protozoaires et bactéries) et les levures (Mouranche et Costes., 1985).

Les Xylanases sont des enzymes synthétisées par une grande diversité de microorganismes comprenant à la fois des champignons *Aspergillus niger* (Ronald et al., 1999) et des bactéries thermophiles comme *Bacillus stearothermophilus*, *Clostridium sterconarium* (Mouranche et Costes., 1985) et les actinomycètes telles que l'espèce *Actinomadura keratinilytica* (Taibi et al., 2011). *Thermoactinomyces thalophilus* (Kohli et al., 2003).

Les xylanases sont fréquemment utilisées dans la formulation d'aliments pour les animaux (amélioration de la digestibilité et de la valeur nutritive), en industries des jus de fruits et brassicoles (amélioration de l'extraction ou la filtration)(Collins et al., 2005).

2.6. Pectinase

Les pectinases sont un groupe d'enzymes qui contribuent à la dégradation de la pectine par divers mécanismes et peuvent être classées en tant qu'estérases, dépolymérase lyases et dépolymérase hydrolytiques (polygalacturonases) (Nicemol et al., 2008).

Les pectinases sont produites par plusieurs espèces de *Streptomyces* telles que *S. lydicus*. Ces enzymes sont utilisées dans l'industrie alimentaire pour l'extraction et la clarification des vins, des jus, des huiles, des aromatisants et de l'industrie textile pour la préparation des tissus de lin. La polygalacturonase est l'une des pectinases les plus importantes qui est largement utilisée dans les différentes industries (Mukhtar.,2017).

3. Caractéristiques des enzymes synthétisées par les actinomycètes

Les principales caractéristiques physicochimiques des enzymes synthétisées par les actinomycètes sont regroupées dans le tableau ci-après.

Tableau 5: Paramètres physico-chimiques des enzymes produites par les actinobactéries (Divya *et al.*, 2013).

Enzymes	Souches Productrices	pH	T °C	Substrats spécifiques
Cellulase	<i>Recombinant streptomyces sp.</i>	5-12	40-50°C	
	<i>Thermobifidahalotolerans</i>	6-8	40-50°C	
	<i>Thermomonospora sp.</i>	7-10	50°C	
	<i>Streptomycesruber</i>	5,5-7	35-40°C	
Xylanase	<i>Actinomadurasp.</i>	4	70°C	Xylan
	<i>Streptomyces spp.</i>	8-11	45-60°C	
Amylase	<i>Streptomyces sp.</i>	5-7	45-50°C	Starch
	<i>Streptomyceserumpens</i>	9-10	45-50°C	
	<i>Nocardiopsis sp.</i>	8-6	70-80°C	
	<i>Thermobifidafusca</i>	5-7	60°C	
Pectinase	<i>Streptomyceslydicus</i>	4-7	45°C	Pölygalacturonicacid
Protease	<i>Thermooactinomyces sp.</i>	4	50°C	Casein
	<i>Nocardiopsis sp.</i>	10	40-50°C	Casein
	<i>Streptomycespactum</i>	7,5	40°C	Keratin
	<i>Streptomyces thermoviolaceus</i>	6,5	65°C	Keratin azure
	<i>Streptomyces sp.</i>	4-11	30-60°C	

A decorative graphic of a scroll, oriented horizontally, with a vertical strip on the left side. The scroll is outlined in black and has rounded ends. The text is centered within the main body of the scroll.

Chapitre III

Matériel et Méthodes

V. Matériel et méthodes

1. Objectif

Le présent travail porte sur l'isolement des actinobactéries genre à partir du sol foresterie de la région de Mostaganem, dont l'objectif est de sélection des isolats producteurs des amylases.

2. Protocole expérimental général

Le protocole expérimental général est représenté dans la figure ci-dessous :

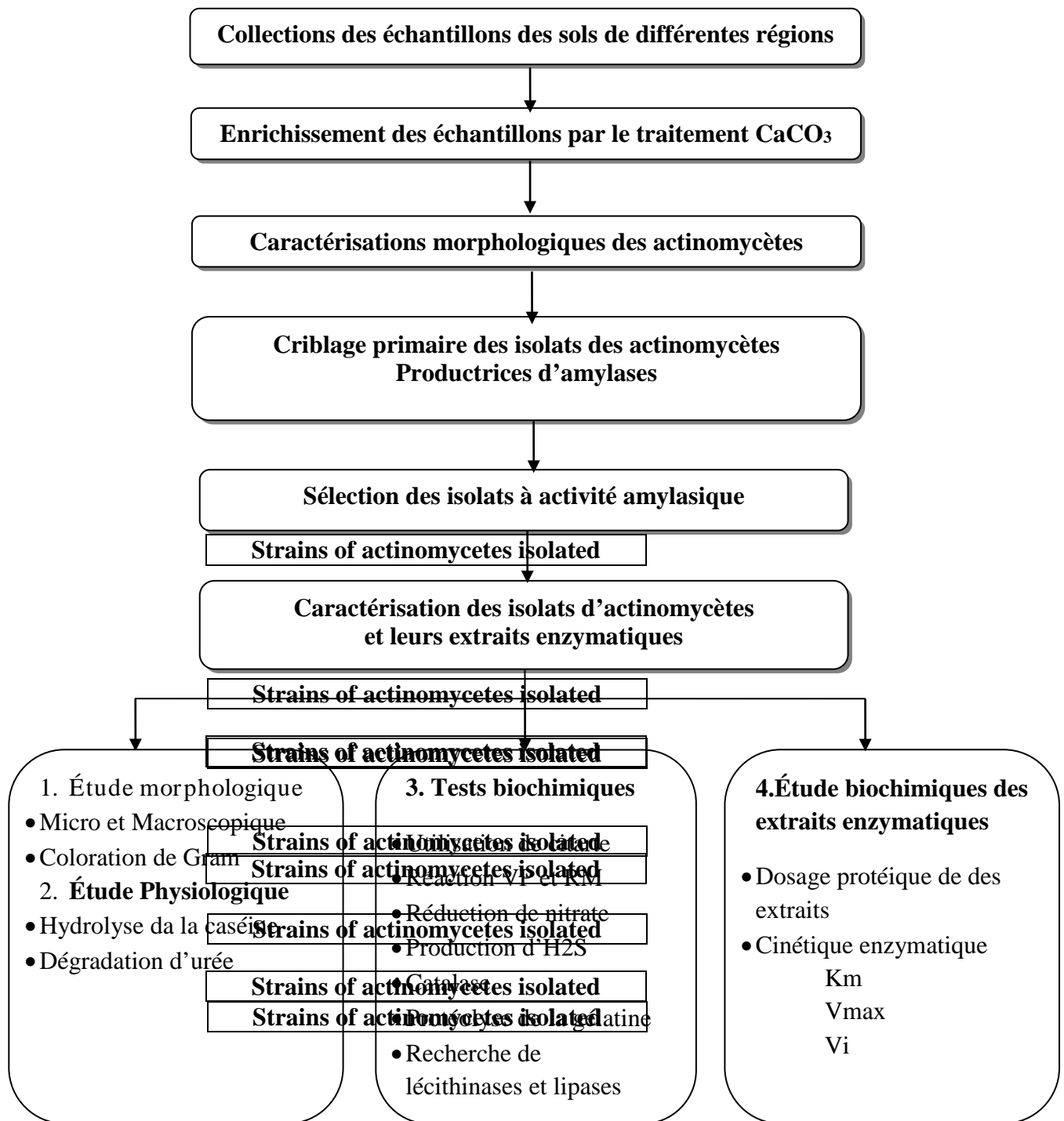


Figure 7 : Protocole expérimental général.

Le protocole expérimental englobe de multiples objectifs et de différentes étapes tels que :

1. Les sites de l'échantillonnage des sols ;
2. L'isolement et la purification des bactéries actinomycètes du genre *Streptomyète* ;
3. Identification de la souche bactérienne par des tests physiologiques et biochimiques ;
4. Tests d'amidon des souches d'actinomycètes afin de sélectionner les souches productrices des amylases.
5. La fermentation submergée des isolats d'actinomycètes dans un milieu nutritif liquide spécifique à base d'amidon et extraction liquide –liquide des Enzymes.

3. Prélèvements des échantillons

L'échantillonnage du sol foresterie pour établir l'isolement des actinobactéries a été réalisé selon la méthode de cinq points à partir dans de la région de Abdel-Malek Ramdan, Wilaya de Mostaganem. Cette région est située à 36° 06' 12" Nord et 0° 16' 34" Est. Elle présente une superficie de 75 km², la température journalière est de 21°C, avec une humidité de 56 %.

Pour le prélèvement de sol, une quantité de 100g de terre est prélevée jusqu'à 5 à 20 cm de profondeur après avoir écarté les trois premiers centimètres de sol, puis déposée à l'aide d'une spatule stérile sur une feuille d'aluminium stérile, après un premier tri écartant les pierres, un échantillon de 50g est récupéré dans un flacon stérile. Ce dernier prélèvement a été effectué pendant le mois de Mai 2018.

4. Isolement des actinomycètes (streptomyète)

4.1. Prétraitement des échantillons

Le prétraitement du sol a été effectué selon la méthode **d'El-Nakeeb et Lechevalier (1963)**, afin, d'augmenté le nombre des actinobactéries et réduire la croissance de la flore fongique et bactérienne contenue dans le sol. Le sol séché à l'air, ensuite, 10 g a été mélangé dans un mortier avec 1% de carbonate de calcium (CaCO₃) et incubé pendant 2 jours à 30 ° C dans une boîte de Pétri stérile (**Sudhanshu et al., 2011; Priyadharsini et Dhanasekaran, 2013**).

4.2. Préparation des dilutions

Les dilutions nécessite 1g d'échantillon de sol est dilué dans 10 ml d'eau physiologique stérile puis agités au vortex deux fois pendant 5 mn. Pour cette suspension des séries de dilutions décimales de 10⁻¹ à 10⁻⁵ sont effectuées.

4.3. Milieux d'isolement

L'isolement des actinobactéries est réalisé sur milieux amidon-caséine et Bennett dont la composition est mentionné dans l'annexe I (**Joffin et Guy, 2014**). Ils sont additionnés de 10 µg/ml d'un antifongique, le pH du milieu est ajusté à 7,2 et stérilisé (120°C/30 minutes).

Les deux milieux sontensemencés à raison de 0,1ml par la dilution 10^0 à 10^{-5} par boîte de pétri (deux boîtes pour chaque dilution). Les boîtes sont incubées à 30°C et sont observées quotidiennement après un 7 à 14 jour d'incubation. Des boîtes témoins de chaque milieu sont incubées sans ensemencement dans les mêmes conditions opératoires (**Mukhtar et al., 2017**).

5. Identification des actinobactéries

5.1. Aspect morphologiques

La morphologie est l'un des critères essentiels d'identification, elle précède l'étude chimique des constituants cellulaires. Lors de l'incubation, les boîtes de Pétriensemencées sont périodiquement et systématiquement examinées à l'œil nu et au microscope optique (**Zeiss**) du faible au fort grossissement. Cela afin, d'observer la morphologie des colonies d'actinobactéries telles que la formation de mycélium aérien et de mycélium substrat, la couleur des pigments diffusibles sur les milieux et la présentation des spores. Ces observations permettent de reconnaître de manière préliminaire les différents genres présents, et de sélectionner les colonies. Les caractéristiques culturelles sont ainsi soigneusement analysées et recherchées (**Praveen et al., 2015**).

5.2. Examen microscopique

Les caractéristiques microscopiques ont été réalisées par la méthode de coloration de Gram pour toutes les souches d'actinomycètes isolées. Cette étape de l'examen directe est essentiel pour apprécier la présence et la morphologie des germes et permet de classer les bactéries en deux grandes catégories (Gram + et Gram -).

- **Les bactéries « Gram positif»** gardent leur coloration violette après décoloration par l'alcool.
- **Les bactéries « Gram négatif»** décolorées par alcool, sont teintées par la fuchsine et apparaissent roses (**Bousseboua, 2002**).

Les principales étapes de cette coloration sont les suivantes :

- Des frottis sont réalisés à partir des colonies des actinobactéries bien isolés à l'aide d'une anse de platine dans des conditions aseptiques.
- Les bactéries sont émulsionnées dans une gouttelette d'eau distillée ;
- Les frottis sont fixés par une flamme à l'aide d'un bec bunzen ;
- Quelques gouttes de violet de gentiane sont déposées sur la lame pendant 1min, puis rinçage par eau distillée.
- Couvrir la lame avec la solution de Lugol pendant 1 minute ;
- Le frottis est décoloré avec de l'alcool pendant 10 secondes, puis rincer à l'eau ;

- Quelques gouttes de la safranine sont déposées sur lame pendant 45 secondes ;
- Après lavage à l'eau, le frottis a été séché avec du papier absorbant
- Observation au microscope optique du faible grossissement 10 jusqu'au G 100x.

6. Criblage primaire des isolats d'activité amylasique

Les isolats d'actinomycètes ont été criblés pour la production d'enzyme extra-cellulaire d'amylase (Praveen *et al.*, 2015).

6.1. Test d'activité amylasique

Les isolats d'actinomycètes ont été criblés pour leurs propriétés amylolytiques par un test d'hydrolyse de l'amidon.

La sélection est effectuée sur un milieu gélose à l'amidon à pH = 7, additionnée d'amidon soluble à 1%, les boîtes sont ensuite incubées à 30°C pendant 5 jours, après incubation une solution de Lugol est versée sur la surface de la boîte, afin de mettre en évidence l'activité amylasique. Les souches à halo clair sur le pourtour, sont considérées comme productrices d'amylases (Joffin et Guy Leyral, 2014; Praveen *et al.*, 2015).

6. 2. Mesure de la zone d'hydrolyse

Une colonie isolée, sélectionnée productrice de l'amylase, âgée de 24h est ensemencée par strie et point sur la surface du milieu de culture gélosé amidon, les boîtes ont été incubées à 30°C pendant 3 jours. Après incubation les boîtes de pétri sont inondées avec une solution de Lugol et l'activité amylolytique est évaluée par la mesure des diamètres des zones d'hydrolyse formées autour de la colonie ensemencée par strie (Tifrit, 2016). Ce paramètre permet le calcul l'index de l'activité amylolytique des souches sélectionnées productrices des amylases. La performance des souches sélectionnées productrices des amylases est effectuée par mesure des diamètres des zones d'hydrolyse formées autour des colonies ensemencées sur un milieu de culture solide et mesure du taux de sucres réducteurs produits dans un milieu de culture liquide.

7. Purification et Conservation des isolats

Les colonies d'actinobactéries positive pour la production d'amylase sont prélevées délicatement à l'aide d'une anse de platine stérile puis purifiées par stries sur milieu amidon caséine agar (Annexe I) et incubés pendant une semaine à 30°C. Cette opération est répétée jusqu'à l'obtention des souches pures. La souche pure doit être conservée à 4°C, pour une utilisation ultérieure des tests biochimiques, physiologiques et la production des enzymes amylases par la fermentation (Shirling et Gottlieb, 1966 ; Micah *et al.*, 2010)).

8. La systématique des isolats d'actinomycètes d'activités amylasique choisis

La systématique des actinomycètes est basée sur trois types de critères : morphologiques, physiologiques et chimiques.

8.1. Caractérisation physiologique

Une série de tests physiologiques utilisés par les taxonomistes pour la différenciation entre certains groupes d'actinobactéries (Holt *et al.*, 1994), est retenue pour l'identification des souches isoler. Ces tests sont : test de l'hydrolyse de la caséine, la dégradation de l'urée (Toumatia, 2015).

8.1.1. L'hydrolyse de la caséine

L'hydrolyse de la caséine a été étudiée sur un milieu gélosé contenant 5% de lait écrémé (voir annexe 1) les boîtes sont ensemencés par une stries. Après, quelques jours d'incubation à 30°C la présence de cette activité est détectée par un halo clair autour de la strie indiquant l'hydrolyse de la caséine contre un résultat (Camille, 2007).

8.1.2. La dégradation de l'urée

Le milieu urée-tryptophane (urée indole) est un milieu synthétique fournissant un ensemble de résultats utiles à l'identification de nombreux germes bactériens. Ensemencer largement la suspension d'urée indole par la culture d'actinobactérie, et incubée à 7 jours à température 30°C. L'observation d'une alcalinisation traduit une hydrolyse de l'urée et donc la souche *Streptomyces* possède l'enzyme uréases. Cette alcalinisation à raison de l'indicateur de pH le rouge de phénol qui se trouve dans le milieu, vire lors d'une réaction positive, de sa couleur de départ jaune orangé au rouge (Joffin et Guy, 2014).

8.2. Caractérisation biochimique

Les isolats d'actinomycètes ont été utilisés pour des études biochimiques tels que : catalase, hydrolyse de la caséine, hydrolyse de l'amidon, test d'agar triple TSI ont été réalisés pour l'identification des isolats puissants (Brzin, 1965). Toutes les cultures ont été incubées à 30°C pendant 24-72 heures (Sudhanshu *et al.*, 2011).

8.2.1. L'utilisation de citrate

Ce milieu ne contient qu'une seule source de carbone, le citrate. Seule les actinobactéries capable d'utiliser le citrate pourront cultiver sur ce milieu. Sachant que le citrate est utilisé selon la réaction

$$\text{Citrate} + 3\text{H}_2\text{O} \longrightarrow \text{acide citrique} + 3\text{OH}^-$$

L'ensemencement d'actinobactéries sur un milieu incliné par des stries longitudinales au moyen d'une anse et suivi d'une incubation à 30°C pendant 7jours.

- L'utilisation du citrate s'accompagnera d'une alcalinisation mise en évidence par le bleu de bromothymol (virage de la couleur du vert en en bleu) (Joffin et Guy, 2014).

8.2.2. Les réactions VP et RM

Sur un milieu liquide Clark et Lubs, une colonie de la souche à étudier est ensemencée puis incubée à 30°C pendant 7 jours. 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. 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 (Joffin et Guy, 2014).

8.2.3. La réduction de nitrate réductase

La présence de nitrate permet la recherche d'une nitrate-réductase, en ajoutant les réactifs habituels pour la recherche des nitrites (réactifs A et B).

L'ensemencement est réalisé sur un milieu liquide nitraté par des actinobactéries, puis incubée à 30°C durant 5 à 7 jours. Après avoir vérifié la présence de culture, ajouter les réactifs nitrites 1 et 2. Une coloration rouge signe la présence de nitrite (bactérie nitrate réductase+ stade nitrite).

En cas d'absence de coloration du milieu, ajouter la poudre de zinc réducteur des nitrates. Attendez quelques minutes :

- Une coloration rouge montre la présence de nitrites : la bactérie est nitrate réductase-
- Une absence de coloration, la réduction des nitrates en azote, le test est positif (le stade nitrite a été dépassé donc les bactéries possédant une nitrate réductase très active) (Camille, 2007 ; Joffin et Guy, 2014).

8.2.4. La production d'H₂S

La présence de thiosulfate de sodium et de fer III dans le milieu permet d'apprécier la capacité des bactéries à produire l'H₂S. Des tubes contenant du milieu TSI sont ensemencés par les bactéries actinomycètes par piqûre centrale puis incubés pendant 14 jours à 30°C. La production de l'H₂S se manifeste par un noircissement du culot (Joffin et Guy, 2014).

8.2.5. La catalase

Cette enzyme empêche l'accumulation d'H₂O₂, dont l'action serait létale pour la cellule bactérienne. L'oxygène libéré se dégage sous forme gazeuse.

A partir d'un milieu solide, prélever une quantité suffisante de culture d'actinobactéries par une anse et la mettre en suspension dans une goutte d'eau oxygénée, déposée sur une lame. Le résultat est positif en présence de l'enzyme catalase, on observe un dégagement immédiat de bulles gazeuses qui démontre que la souche contient une enzyme ayant la propriété de décomposer le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) (Joffin et Guy, 2014).

8.2.6. Protéolyse de la gélatine

La gélatine est un produit protéiné obtenu par hydrolyse partielle du collagène. Ce test est utilisé pour la mise en évidence de l'enzyme gélatinase. Il est étudié sur gélose nutritive additionnée de gélatine à raison de 4g/l. Couler le milieu gélose à la gélatine en boîte de pétri, ensemercer en touche ou en stries par anse à la surface du milieu étant bien sèche, et incubé à 37°C. Après l'incubation, verser sur le milieu 1 ou 2ml du réactif chlorure de mercure II.

- Résultat positif : gélatinase présente : absence de précipité blanchâtre autour de la strie d'ensemencement démontre l'absence de gélatine dans cette zone.
- Résultat négatif : absence de gélatinase : il se traduit un précipité blanchâtre partout où la gélatine n'a pas été hydrolysée.

8.2.7. Recherche de lécithinases et lipases

Les protéases hydrolysent les lipoprotéines et libèrent des lécithines solubles des protéines et des lipides ce qui traduit par un éclaircissement autour de la culture.

Ajouter à la gélose nutritive maintenue en surfusion à 45% d'émulsion de jaune d'œuf. Faire une strie à la surface du milieu puis incubé 1 à 5 jours à 37°C (**Joffin et Guy, 2014**).

Après l'incubation si :

- Un halo opaque blanc-jaunâtre et parfois la zone d'opacification ne déborde que peu ou pas autour de la culture signifie léchitinase positif.
- Il n'y a pas de halo de précipitation signifie léchitinase négatif.
- Une zone de protéolyse est transparente, une zone d'opacification de léchitinase positif et lipoprotéinase positif
- Une zone de protéolyse transparente signifie que le test de léchitinase négatif, et lipoprotéinase positif (**Joffin et Guy, 2014**).

9. Production d'amylase par fermentation submergée

La figure ci-dessous résume les principales étapes de la fermentation :

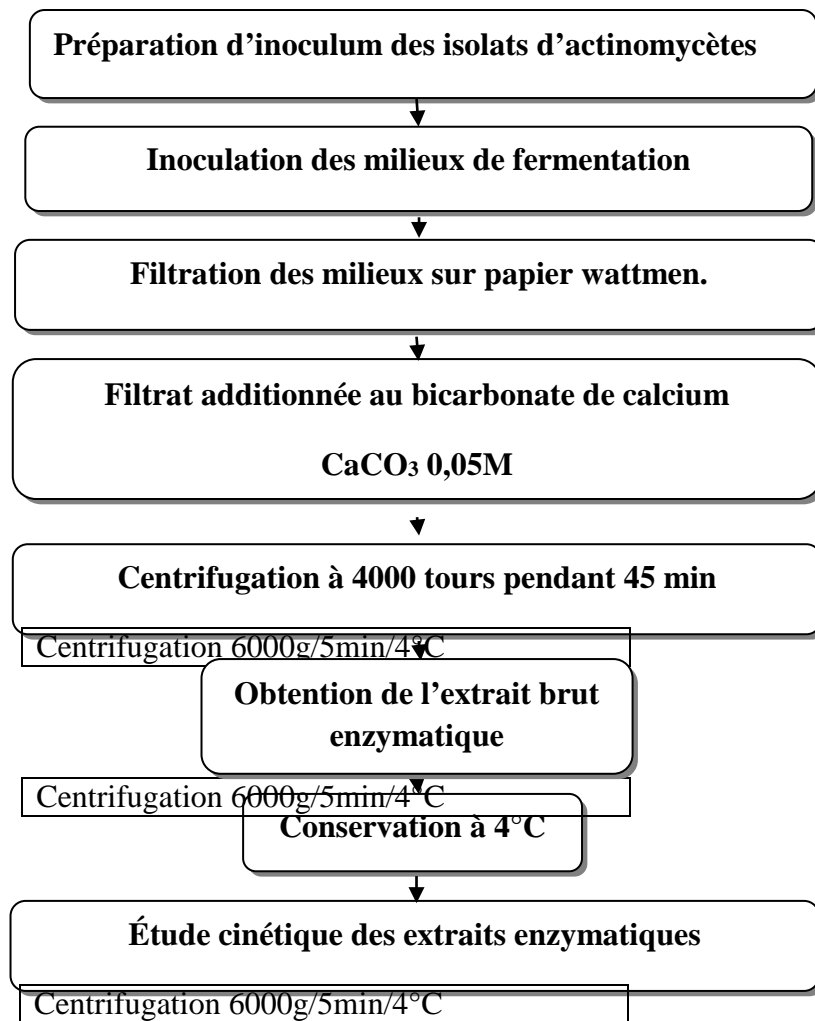


Figure 8 : Diagramme d'obtention de l'extrait enzymatique des isolats d'actinomycètes.

Centrifugation 6000g/5min/4°C

9.1. Sporulation des souches sélectionnées

La croissance et la formation des spores d'actinomycètes sur des milieux gélosés sont très importantes pour plusieurs raisons telles que la production de métabolites secondaires et divers protocoles de manipulation génétique (Micah *et al.*, 2010). Les souches d'actinomycètes sélectionnés sont cultivées sur le milieu de Bennett. La culture est incubée à 30°C pendant 5 jours. Après la sporulation, les spores sont mises en suspension par l'addition de 10 ml de l'eau distillée stérile et agitation manuel. La suspension sporulée va servir à l'inoculation des milieux de culture d'extraction (Solis-Pereira *et al.*, 1993). Le comptage des spores a été estimé par mesure de l'absorbance à $\lambda = 620$ nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV-visible (Saci, 2012 ; Naglaa *et al.*, 2017). La suspension de spores est diluée à l'aide d'eau distillée stérile jusqu'à obtenir une densité optique DO = 1,5 qui correspond environ à une concentration de 10^7 CFU/ml (Saci et Safane, 2015).

9.2. Inoculation des milieux de fermentation

Le milieu de cultures précédemment préparés est inoculé par 5 ml de la suspension sporale (10^7 spore/ml) de l'isolat d'actinomycètes sélectionné dans un Erlenmeyer de 250 ml contenant 100 ml du milieu liquide à base d'amidon. Ensuite, ils sont incubées à 30°C pendant 5 jours sous agitation continue à une vitesse de 120 rpm (**Ragunathan et Padhmadras, 2010 ; Khwaja, 2011**).

9.3. La fermentation submergée et extraction de l'enzyme

La fermentation submergée est une fermentation où le substrat est soluble, permettant une bonne solubilisation des composants de milieu. Après le 5^{ème} jour, la culture a été filtré à travers du papier filtre Whatman et en présence de bicarbonate de calcium (CaCO_3 0,05 M). Le filtrat a été centrifugé à 4000 tours pendant 45 minutes pour éliminer le culot. Le surnageant a été recueilli sous forme d'enzyme brute et utilisé pour l'estimation de l'enzyme amylolytique et l'étude cinétique (**Khwaja, 2011**).

10. Étude de la cinétique des extraits enzymatiques

L'extraction est basée sur la libération des enzymes des cellules ou des constituants cellulaires. Elle nécessite un éclatement de la paroi ou de la membrane cellulaire, par des méthodes physico- chimiques (**Laurent, 1982**). Une filtration a été effectuée pour séparer le mycélium et récupérer le filtrat. Ce dernier a été traité par le bicarbonate de sodium 0,05 M (V/V). 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**).

10.1. Dosage colorimétrique par la méthode de Biuret des l'extraits enzymatiques

En milieu alcalin et chaud le cuivre Cu^{+2} 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 le composé coloré en présence de cuivre (CuSO_4), car 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.

10.2. Étude cinétique des extraits enzymatiques**10.2.1. 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 μmol [DO = f [(C)]].

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 par la 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 mis 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_{max} : Vitesse maximale d'oxydation ($\mu\text{mol.l}^{-1}.\text{min}^{-1}$);

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

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

A decorative border resembling a scroll, with a vertical strip on the left and rounded corners on the right, framing the chapter title.

Chapitre IV
Résultats et Discussion

IV. Résultats et discussion

1. Isolement et purification des actinobactéries

L'isolement des actinobactéries mycéliennes effectués sur le milieu amidon-caséine présente un nombre important, plus de huit 8 isolats (fig. 9), par rapport et au milieu Bennett où le nombre est très réduit. Les différentes souches montrent une variation morphologique qui va être présentée et discutée ultérieurement. Le milieu amidon caséine présente les meilleures caractéristiques physicochimiques pour l'isolement et le développement des actinobactéries.

Plusieurs travaux des auteurs comme **Lakshmipathy (2010)**, **Sudhanshu (2011)**, **Palanisamy (2013)**, ont travaillé sur l'isolement et la caractérisation des actinomycètes confirmant que le meilleur milieu pour l'isolement est l'amidon caséine, suivi par le milieu Bennett. Toutefois, d'autres travaux ont confirmé que le milieu CAA est efficace pour l'isolement sélectif des actinobactéries à partir d'écosystème varié. Selon **Sharma et al., (2011)**, ce milieu a permis d'isoler environ 134 actinomycètes à partir des échantillons des sols Indian..

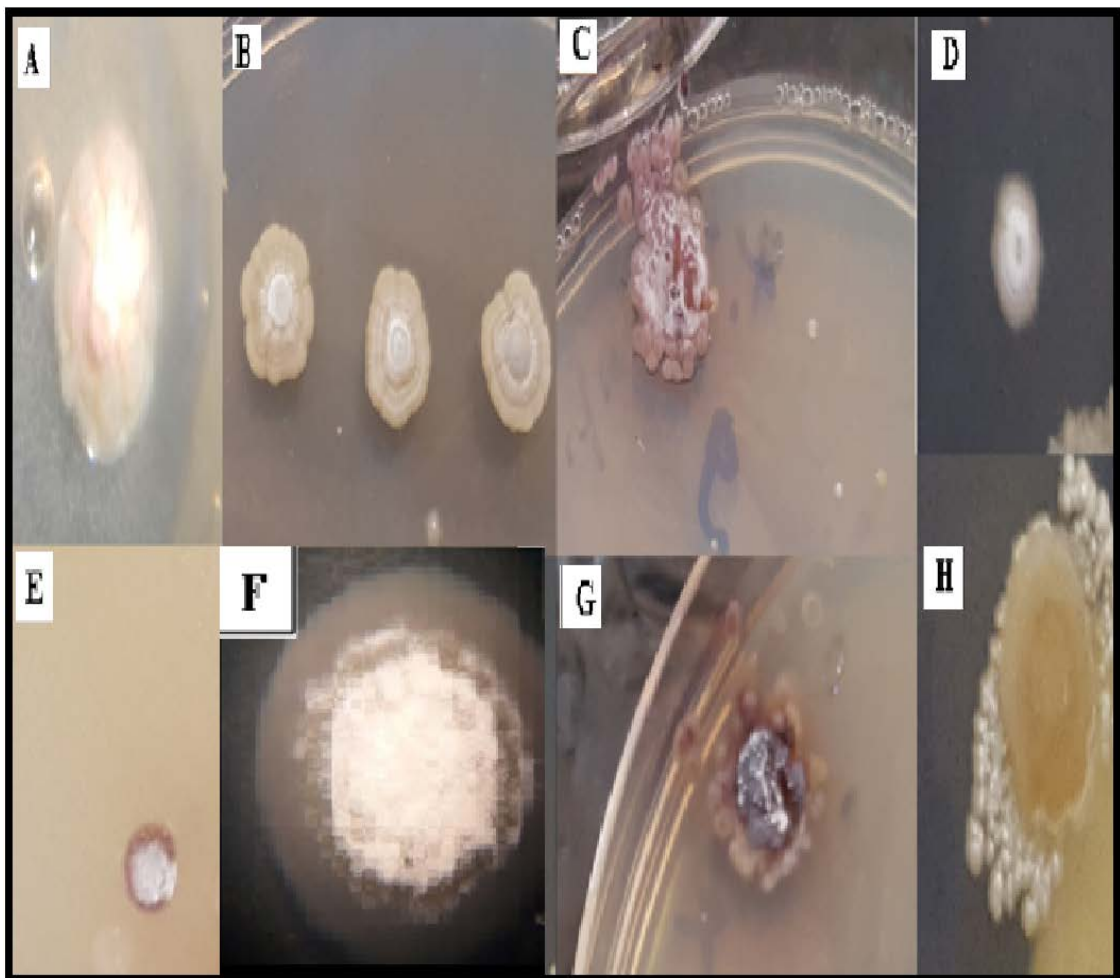


Figure 9: Observations macroscopiques des colonies d'actinobactéries à l'aide d'une loupe binoculaire 4x10. A, B, C, D, E, F, G et H : Isolats de différentes formes et couleurs.

D'après **Sudhanshu (2011)** et **Palanisamy (2013)**, confirment que l'utilisation de bicarbonate de calcium CaCO_3 comme prétraitement des sols donne un bon isolement et augmente le nombre des populations actinobactérienne dans le sol. Ce prétraitement a réduit le nombre des bactéries à Gram négatif dans les échantillons des sols.

2. Caractérisation des actinobactéries

2.1 Études morphologique

L'observation à l'œil nu, à la loupe binoculaire et au microscope optique des colonies isolé sur les milieux caséines et Bennet montrent les mêmes caractéristiques morphologiques des actinobactéries mycéliennes décrit dans plusieurs travaux en particulier de **Sudhanshu (2011)** et **Rajesh Muthu (2013)**.

Les filaments du mycélium aérien et du substrat sont ramifiés, très fins et de pigments diffusibles de couleurs différentes. Au total plus de huit isolats sont obtenus dont trois 3 isolats sont identifiés et caractérisés comme des *Streptomyces sp* sur la base de leur diversité culturelle et morphologique remarquée lors de l'observation (tab 6, fig 10).

Tableau 6 : Caractérisations macroscopiques et microscopiques des isolats des *Streptomyces sp*

	Taille	Milieu de culture	Mycélium Végétatif	Mycélium aérien	Forme
isolats des <i>Streptomyces sp</i>	Petite	Bennett	Crème	Blanc	Bombé
	Moyenne	Caséine amidon	Rouge	Blanc	Bombé
	Petite	Caséine amidon	Marron	Blanc	Bombé

Les huit isolats obtenues sont des tailles différentes (petite, moyenne, grande) de formes variables (lisse, bombé, aplatie etc.) et incrustées dans la gélose de couleurs différentes (jaune, blanche, rouge etc.). Elles possèdent un mycélium végétatif surmonté d'un mycélium aérien de couleurs différentes jaune, blanche, marron, beige, verdâtre, brun etc. L'aspect microscopique indique que tous les isolats ont un aspect filamenteux ramifié ou non. Parfois, il est fragmenté, comme certaines espèces des actinobactéries.

2.2. Criblage primaire

Le criblage primaire a permis la sélection, la purification et la caractérisation de trois isolats de *Streptomyces sp* parmi les 8 isolats d'actinobactéries) (fig. 10).

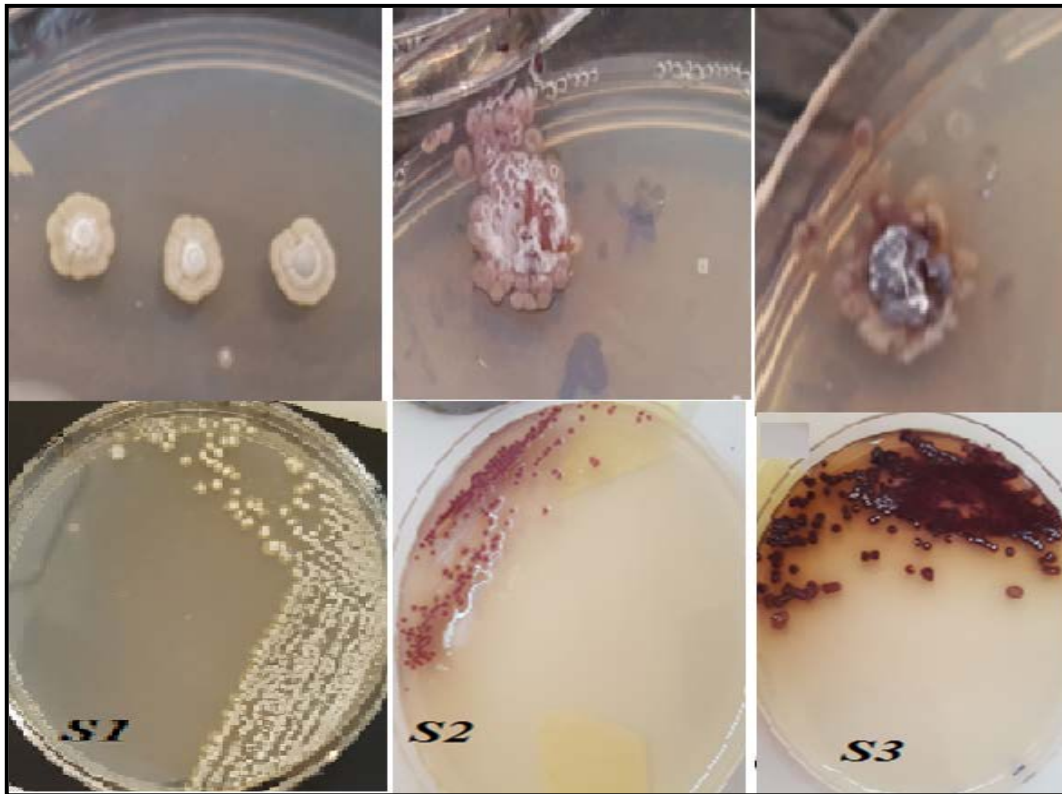


Figure 10 : Trois souches isolées et purifiées de *Streptomyces* sélectionnés.

Le criblage des que trois souches isoler et purifier par les tests d’hydrolyse d’amidon révèlent des zones d’hydrolyse d’amidon très important par rapport aux autres isolats (tab.7 et fig. 11). D’après *Aneja et al. (2003)*, l’index d’activité amylolytique à été calculé selon la formule suivante.

$$\text{Index d'activité amylolytique} = \frac{\text{Diamètre de la zone hydrolyse} - \text{Diamètre de colonie}}{\text{Diamètre d'hydrolyse}}$$

Tableau 7 : Présentation des résultats de diamètre de la zone d’hydrolyse et l’index d’activité amylolytique des isolats du *Streptomyces.sp.*

Souches	S1	S2	S3
Diamètre de zone en mm	1,5	1,6	3,2
Index d’activité amylolytique	0 ,5330	0,571	<u>0,843</u>

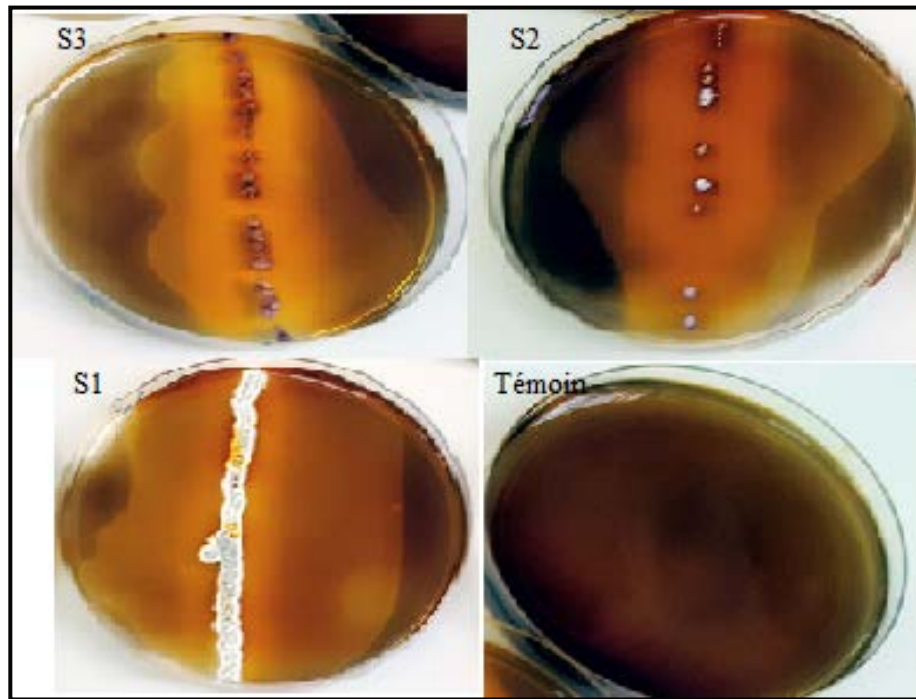


Figure 11: Tests d'hydrolyse d'amidon des trois souches de *Streptomyces.sp* d'actinobactéries. D'après **Rajshree et al. (2011)**, une réaction positive de la dégradation d'amidon du milieu, signifie une production d'amylase par les bactéries. Les résultats obtenues sont positifs et se manifestent par l'apparition des zones d'hydrolyses claires autour des cultures. Le diamètre des zones mesurées varient de 1,6 à 3,2 mm (tab.7 et fig. 11 et 12) La souche **S3** présente une zone d'hydrolyse d'amidon importante à celle des souches **S2 et S1**.

L'étude de la production de l'amylase des souches sélectionnées sur milieu de culture riche en amidon donne des résultats intéressants, dont le calcul de l'index de l'activité amylolytique révéla une importante variabilité. Une valeur maximale de 0,843 est enregistrée pour la souche S3, caractérisée par un potentiel de production des amylases très élevé par rapport aux autres souches.

2.3. Aspect microscopique

Les observations microscopiques des six souches présentent des mycéliums de substrats formés de longs hyphes fins, ramifiés, non septés ni fragmentés et ne portant pas de spores. À partir de ces hyphes les souches développent un autre mycélium aérien par croissance apicale, moins ramifié que celui du substrat. Il se différencie aux extrémités des hyphes en longues chaînes de spores de forme cylindrique, non mobiles et arrangées en structures sporangies. Par manque de moyens pour avoir des bonnes images, malheureusement, on n'a pas pu photographier les détails de la description microscopique. Bien que, la qualité de l'image de la figure ci-dessous est très faible, elle montre le mycélium aérien aux différents grossissements.

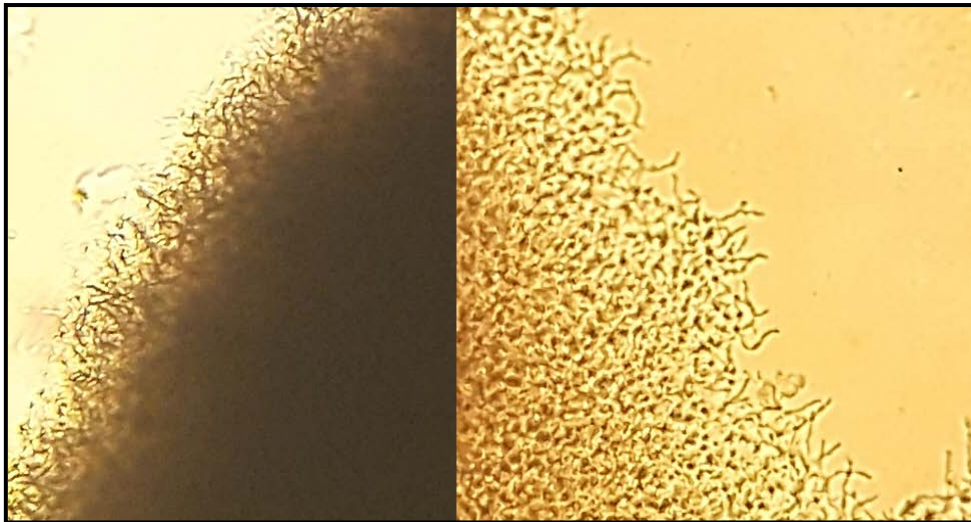


Figure 12 : Observation direct de mycélium aérien au microscope optique (GX 40 et 100).

Beaucoup des travaux qui ont été établies sur la taxonomie, la physiologie, les produits naturels des actinobactéries, la différenciation du mycélium et développement de *Streptomyces sp* confirment les résultats obtenus. D'après **Sabaou (1988)** et **Zerizer et al. (2005)**, et **Beatriz (2014)**, **Toumatia (2015)**, **Barka (2016)**, l'identification actinomycetale productrice d'antibiotiques isolées de sols rappellent le genre *Streptomyces*. Ils sont caractérisés par un mycélium aérien (MA) dont les filaments produisent des chaînes de spores plus ou moins longues, portées par des sporophores relativement bien développés, et un mycélium du substrat (MS) non fragmenté. Les mêmes résultats sont obtenus sur *Streptomyces sp* isoler à partir du sol de la région de Ouilis (W. Mostaganem).

2.6. Coloration de Gram

Les trois souches de *Streptomyces* examinées pour la coloration de Gram sont de Gram+. D'après **Aouiche et al.,(2012)**, et **Bhagabati et all. (2015)**, **Rosilma et all. (2016)** et ils ont confirmé que tous les actinobactéries sont de Gram positive (fig. 13).

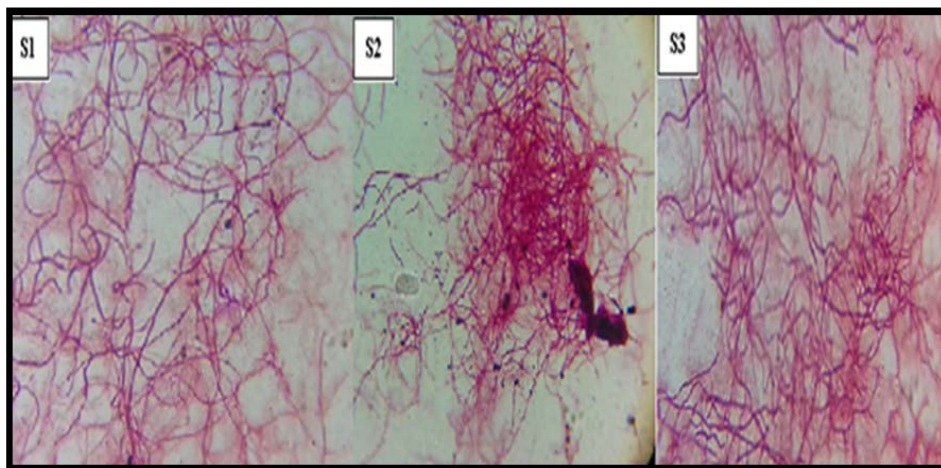


Figure13 : Coloration de Gram des trois souches de *Streptomyces sp* isolé.

3. Tests physiologiques et biochimiques

Les résultats des différents tests physiologiques et biochimiques des 3 souches de *Streptomyces* *sp* sélectionnées sont présentés dans le tableau ci-dessous.

Tableau 8 : Tests physiologiques et biochimiques des isolats d'actinomycètes.

Caractéristiques		TM	S1	S2	S3
Les Souches					
Hydrolyse de la caséine		-	+	+	+
Hydrolyse de l'amidon		-	+	+	+
Hydrolyse de la gélatine		-	+	+	+
Réduction des nitrates		-	-	+	+
Lécithinase et lipoprotéinase	Lécithinase	-	+	+	+
	lipoprotéinase	-	-	+	+
Production d'H ₂ S		-	+	+	+
Recherche de Catalase		-	+	+	+
Dégradation de l'urée		-	+	+	+
L'utilisation de citrate		-	-	-	-
Les fermentations intermédiaires	VP	-	-	-	-
	RM	-	+	+	+

TM : Témoin ; S : Souche ; (+) : Test positif ; (-) : Test négatif ; VP : Vogues Prauskouer ; RM : Rouge méthyle

Une série de tests physiologiques utilisés par les taxonomistes pour la différenciation entre les espèces des actinomycètes est retenue pour l'identification des souches isolées. Les résultats de ses différents tests sont cités et discutés ci- après.

3.1. Hydrolyse de la caséine

La présence d'halo d'éclaircissement autour de la culture signifie que les résultats sont positifs pour toutes souches isolées de Streptomycètes (tab. 8 et fig. 14). Cette dégradation de caséine est due à la présence de caséinase.

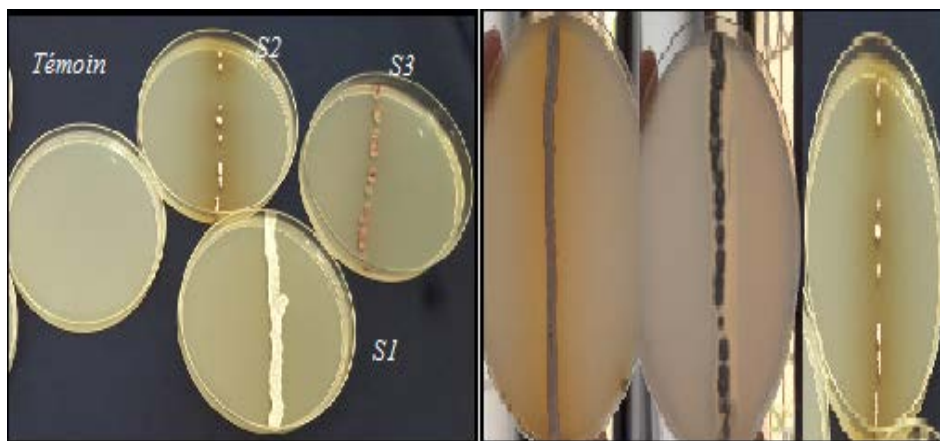


Figure 14 : Les résultats des tests d'hydrolyse de la caséine.

Plusieurs travaux réalisés sur les actinobactéries prouvent que la plupart des souches *Streptomyces sp* peuvent hydrolyser les caséines du lait (Mihaela *et al.*, 2011 ; Palaniyandi *et al.*, 2013 ; Boughachiche *et al.*, 2016).

3.2. Hydrolyse de la gélatine

Les résultats obtenus de ses tests sont positifs, la gélatine du milieu a été dégradée par la gélatinase sécrétée par les *Streptomyces sp*. Des zones claires correspondant autour des cultures reflètent une bonne dégradation de la gélatine. Les diamètres de ces zones varient selon l'espèce *Streptomyces sp*, où on a remarqué une forte hydrolyse de la gélatine par la souche S3 (fig. 15).

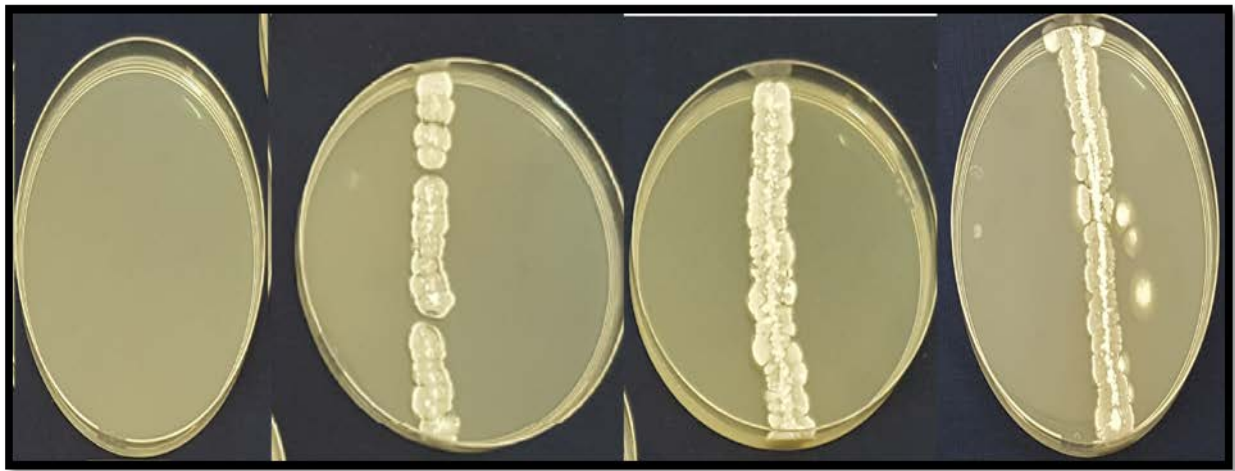


Figure 15 : Test positif d'hydrolyse de la gélatine en présence des *Streptomyces sp*.

Ces résultats ressemblent aux résultats des travaux de Won-Jae Chi *et al.* (2003), sur la présence d'enzyme gélatinase chez les *Streptomyces sp*.

3.3. Recherche de lécithinases et lipases

La figure ci-dessous (fig. 16) présente les résultats des tests de lécithinases et lipases, les souches S1, S2 et S3 possèdent l'enzyme lécithinase.

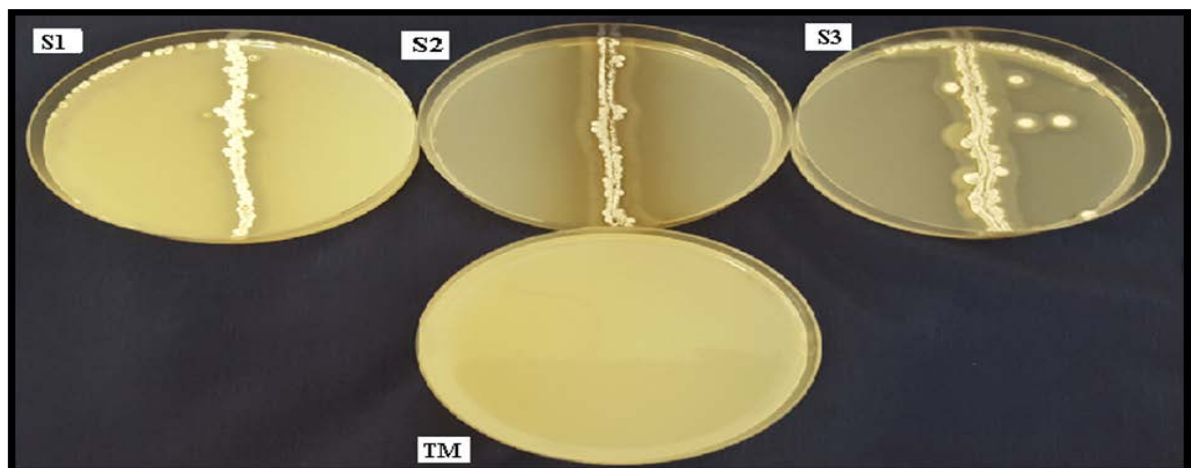


Figure 16 : Test positif d'hydrolyse de la Lécithine en présence des *Streptomyces sp*.

La lécithinase permis de dégrader la lécithine. Les souches S2, S3 présentent des résultats positifs avec le test. Les souches possèdent les lipoprotéinase, qui sont des enzymes lipases qui hydrolysent les triglycérides et les protéinases qui hydrolysent les lipoprotéines. Le résultat présent une zone de protéolyse transparente traduit l'hydrolyse de la lécithine et une zone d'opacification hydrolyse les lipoprotéines. Ces résultats sont similaires aux travaux de **Das et al. (2012)**, **Minotto et al. (2014)** in **Cheriet et al. (2016)**.

3.4. Réduction des nitrates

Les souches de *Streptomyces* sp (S2, S3) (fig. 17) présentent un changement de couleur après l'ajoute des réactifs NR1 et NR2 qui indique que le test est positif. Les mêmes résultats sont indiqués par **Boughachiche et al., (2016)**. Par contre, le résultat est négatif pour la souche (S1), qui présente une couleur rouge après l'ajoute de la poudre de zinc. Ce résultat est identique aux travaux de, **Aouiche et al. (2012)**, sur l'activité antimicrobienne de *Streptomyces* sp des sols d'origine saharienne.



Figure 17 : Résultats des tests réduction des nitrites pour les souches de *Streptomyces* sp.

3.4. Production de sulfure d'hydrogène (H₂S)

Après l'incubation des souches pendant 14 jours sur le milieu TSI, l'apparition d'une coloration noire dans le milieu signifie que les trois souches sont productrices de l'H₂S, en présence du témoin qui reste de couleur jaune (fig. 18).

Le sulfure d'hydrogène réagit avec les ions fer III (Fe³⁺) du citrate de fer pour former un précipité de sulfure de fer noir.

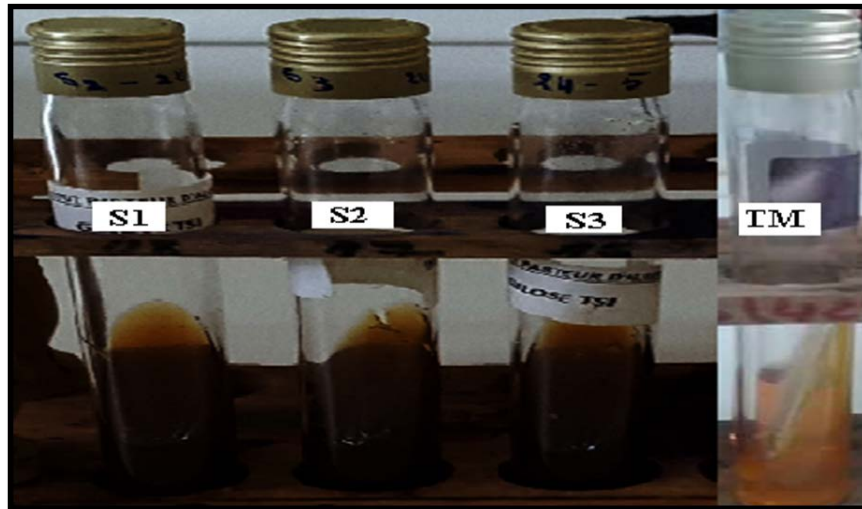


Figure 18 : Tests positifs de production d' H_2S avec les trois souches *Streptomyces* sp.

Nous avons obtenues des résultats similaires aux travaux de **Küster et Williams (1964)**, et de **Tresner et Danga (2018)**, qui ont travaillé sur la production d' H_2S par des espèces de *Streptomyces* sp.

3.5. Recherche de Catalase

L'examen de la recherche de catalase, montre un résultat positif. Tous les isolats des *Streptomyces* sp, sont de catalase positive, l'appariation de bulles d air signifie la présence de catalase. Le catalase est une oxydoréductase héminique qui catalyse la réaction du peroxyde d'hydrogène H_2O_2 en eau et dioxygène O_2 (fig. 19).



Figure 19 : Tests positifs des isolats de *Streptomyces* sp.

Le test de la recherche de catalase est positif pour l'ensemble des isolats de *Streptomyces* sp. Les chercheurs **Tortora et al. (2003)** in **Abbes Samiha et Bouteraa (2017)**, **Sudhanshu Dwivedi et al. (2011)** ont obtenus les mêmes résultats.

3.6. Dégradation de l'urée

Les tests de dégradation de l'urée obtenues sont positifs, les souches de *Streptomyces* sp S1, S2, S3 possèdent des uréases. Ces enzymes sont responsables de la dégradation de l'urée, avec production de dioxyde de carbone et d'ammoniac. Ce dernier provoque une alcalinisation du milieu, qui se traduit par le virage de la couleur du rouge orangé vers le rouge (fig. 20).

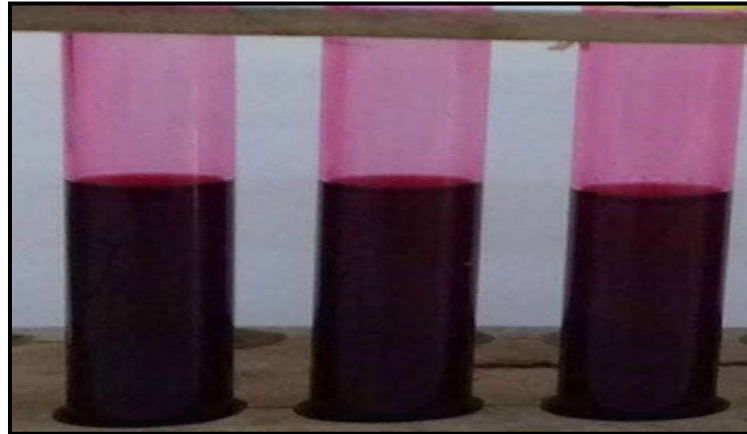


Figure 20: Tests positifs de dégradation de l'urée en présence des six isolats de *Streptomyces* sp. Les mêmes résultats sont obtenus par les chercheurs qui ont montrés que les souches de *Streptomyces* sp peuvent dégradés l'urée (Baskaran *et al.*, 2014).

3.7. L'utilisation de citrate

Les souches S1, S2, S3 de *Streptomyces* sp n'utilise pas le citrate de Simmons comme une source de carbone, on n'a pas observée le virage de la couleur du milieu citrate vers bleue (fig. 21).

Les mêmes résultats obtenus sur les *Streptomyces* sp sont publiés par Pathalam Ganesan *et al.* (2017) et Harir Mohamed *et al.* (2017).

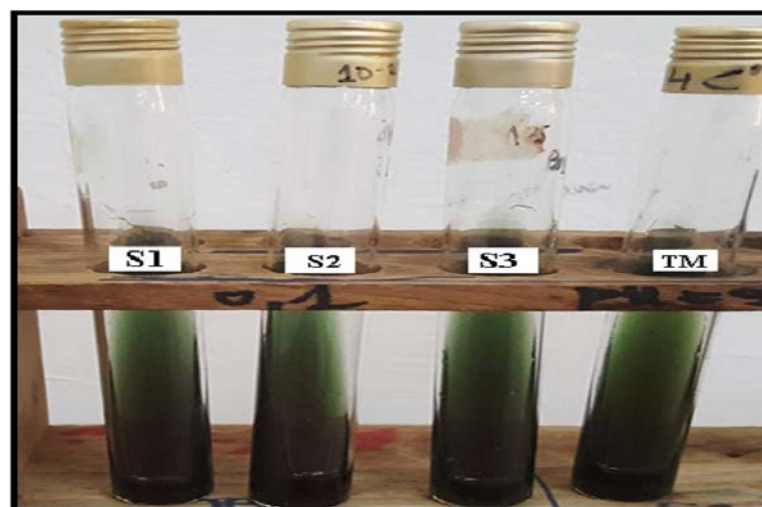


Figure 21 : Tests négatifs d'utilisation de citrate en présence des isolats de *Streptomyces* sp.

3.8. Les réactions de VP et RM

Les tests de VP sont négatifs aucun changement de couleur des milieux enregistrés. Par contre, les RM sont positifs, la couleur des milieux à virer vers le rouge (fig. 22). Les souches de *Streptomyces* sp. (S1, S2, S3) assurent les réactions des acides mixtes en présence du réactif RM. Les mêmes résultats sont obtenus par plusieurs chercheurs **Gouse Basha Sheik et al. (2017)**, et **Pathalam Ganesan et al. (2017)**.

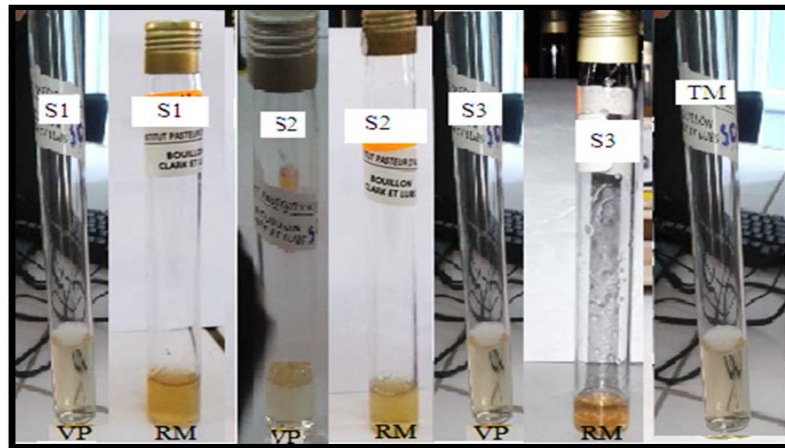


Figure 22 : Tests négatifs de VP et positifs de RM avec les isolats de *Streptomyces* sp.

4. Production des extraits enzymatique des isolats *Streptomycètes* sp

4.1. Dosage des extraits enzymatiques par la réaction de Biuret

La méthode colorimétrique de biuret effectuée pour le dosage des protéines, et est exprimée par la concentration des extraits protéiques des enzymes solubles dans le milieu liquide d'extraction des isolats de *Streptomyces* sp. Cette quantification est réalisée grâce au dosage des dilutions de la protéine ovale albumine dans les mêmes conditions opératoires (pH= 5 et T= 40°C) (Fig. 23).

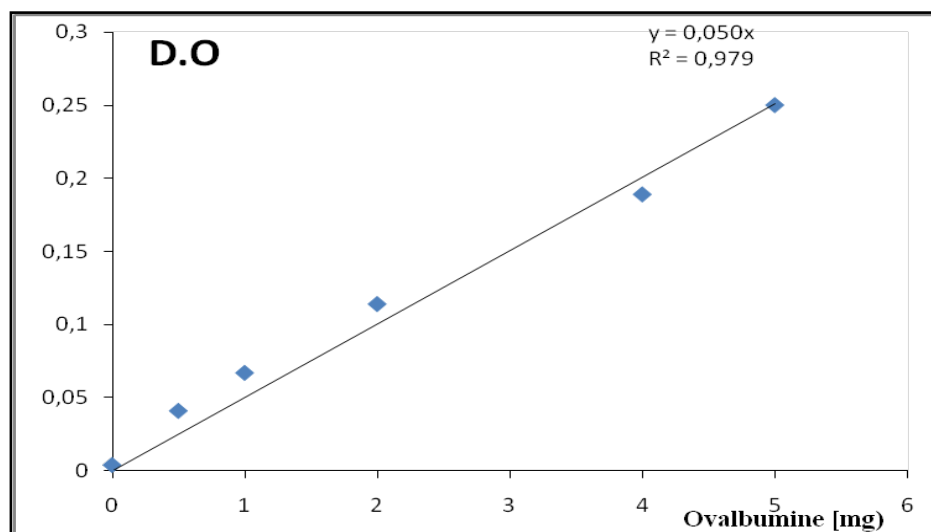


Figure 23 : Courbe de la gamme d'étalonnage de la protéine ovalalbumine.

Les figures 23 et 24 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 concentrations des extraits protéiques confirment les résultats des tests d'hydrolyses. L'isolat de *Streptomyces* sp S3 renferme une concentration protéique supérieure aux autres isolats S2 et S1 avec des valeurs respectivement de 0,565 ; 0,184 et 0,112 g/l (fig. 24).

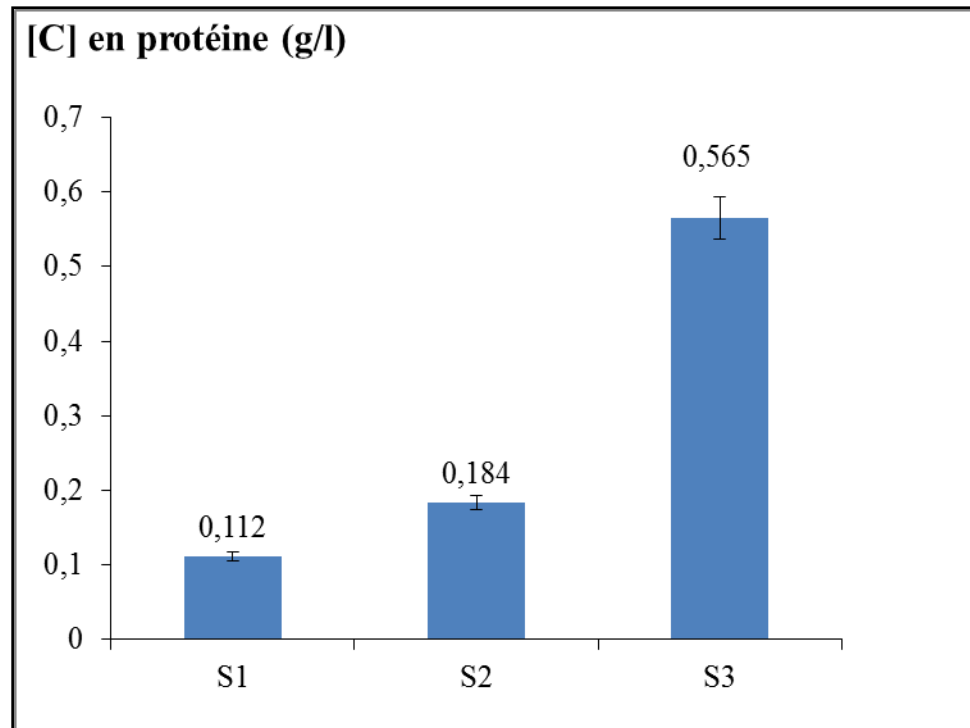


Figure 24 : Concentrations des extraits protéiques des trois isolats *Streptomyces* sp.

Les résultats obtenus sont cohérents avec ceux obtenus par les tests des paramètres cinétiques K_m , V_{max} et V_i qui seront abordés et discuté ci-dessous.

4.2. Cinétique des extraits d'amylasiques des isolats *Streptomycètes* sp

Les extraits enzymatiques des amylases obtenus à partir des isolats de *Streptomycètes* 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 de la réactive 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. 25 et fig. 26).

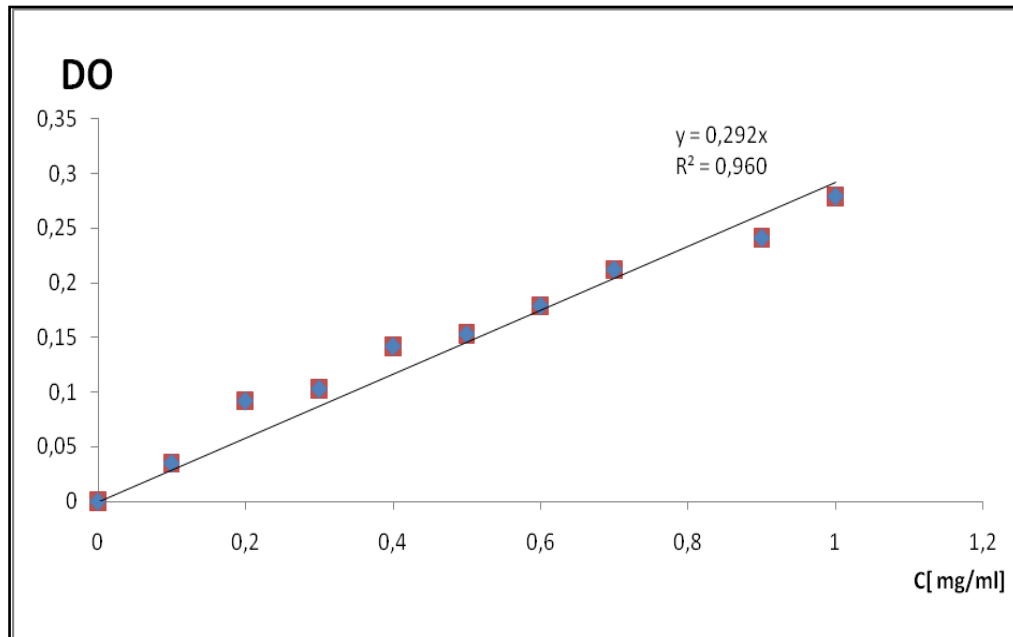


Figure 25 : Courbe de la gamme d'étalonnage du sucre réducteur pur le glucose.

La gamme d'étalonnage du sucre réducteur pur le glucose 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.

On a constaté une variation dans les activités amyliques des extraits enzymatiques des trois souches en fonction du temps (fig. 26). Le dosage des produits libérés au cours des différentes réactions présentent respectivement des valeurs supérieures de 1,38 et 1,043 μmol de glucose /ml pour les isolats S3 et S2. En effet, dans les essais à blanc (témoins) réalisés en absence des extraits d'amylase, le substrat n'a pas été hydrolysé. Le réactif de Fehling garde sa couleur.

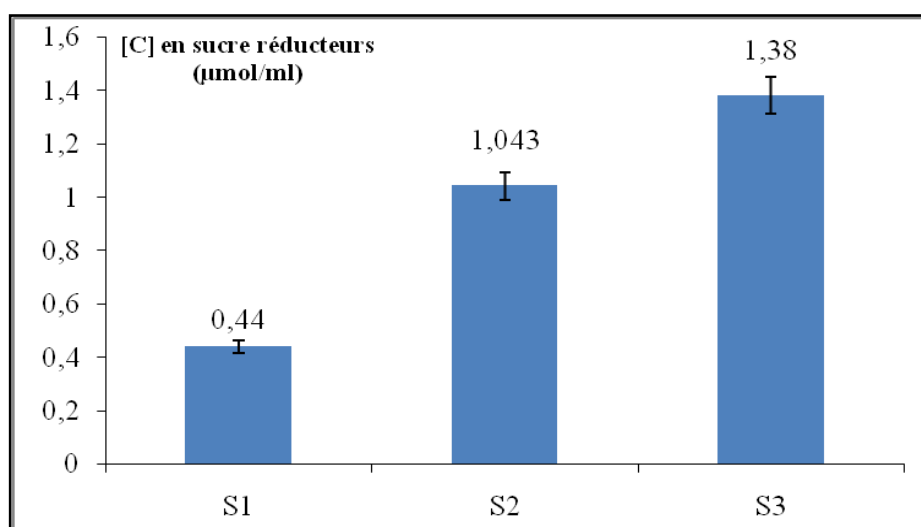


Figure 26: Quantités du glucose libéré après hydrolyse d'amidon obtenus en présence des extraits enzymatiques de *Streptomyces* sp.

Cette méthode confirme que les extraits enzymatiques sont riches en amylases. Selon **Ragunatha et Padmadas, (2013)**, les *Streptomyces* sont la source la plus commune de cette enzyme.

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. 8, fig. 27). 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 l'équation de Michaelis-Menten pour évaluer les constantes cinétiques 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_{max} : Vitesse maximale d'oxydation ($\mu\text{mol.l}^{-1}.\text{min}^{-1}$);

[S] : Concentration en substrat (Saccharose) (mol.l^{-1});

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

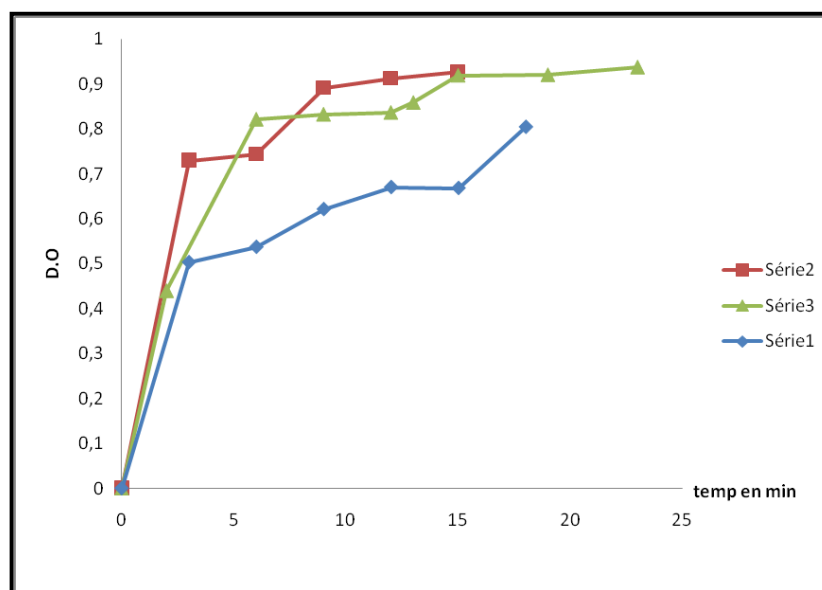


Figure 27: Cinétique enzymatique des extraits d'amylases en fonction du temps.

Les représentations graphiques expérimentales des résultats sont utilisées pour la détermination des paramètres cinétiques K_m et V_{max} des extraits d'amylases de différentes souches.

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 S2 et S3 présentent des densités optiques élevées à celle de l'extrait de la souche S1 (fig. 27).

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 9).

Tableau 9 : Paramètres cinétiques des extraits d'enzymes des isolats de *Streptomyces* sp.

Les souches	Km	Vmax mol l ⁻¹ min ⁻¹	V _i mol l ⁻¹ min ⁻¹
S1	8,08×10 ⁻³	0,56×10 ⁻³	0,006
S2	0,19×10 ⁻³	0,19×10 ⁻³	0,1
S3	0,15×10 ⁻³	0,20×10 ⁻³	0,13

Les valeurs du Km les plus faibles (0,19×10⁻³ et 0,15×10⁻³) sont notés pour les souches de *Streptomyces* sp. S2 et S3 avec des vitesses supérieures par rapport à la souche S1 (tab 9). Selon **Cheftel et Cheftel (1977)**, **Cheriot (2007)**, et **Mafart et bellard (2004)**, le Km traduit l'affinité de l'enzyme avec le substrat, plus le Km est faible plus cette affinité augmente. Les souches de *Streptomyces* sp. S2 et S3 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 les résultats (**Khwaja, 2011 ; Ragunathan et Padhumadas, 2013**).



***Conclusion et
Perspectives***

Conclusion et perspectives

Les amylases réveillent une grande importance biotechnologique dans de nombreuses industries tels : que l'agroalimentaire, pharmaceutique, chimie industrielle, l'écologie etc. Grâce à leur utilisation potentielle et leurs diverses exploitations comme biocatalyseurs, ces enzymes contribuent avec un apport de 30% du marché mondial de la commercialisation des enzymes industrielles.

Dans ce travail, l'isolement et l'identification préliminaire des actinobactéries du sol de la région de Abd Imalek ramdan (wilaya de Mostaganem) sur un milieu sélectif riche en amidon révèle un nombre relatif (plus de dix). Trois isolats (S1, S2, S3) sont retenus et caractérisés sur la base des observations macroscopiques et microscopiques. Ces isolats sont identifiés, il s'agit de *Streptomyces* sp. Le développement de ces isolats est plus ou moins rapide (7 à 10 jours), ils présentent des filaments septés, les surfaces des colonies sont lisses, poudreuses etc. La couleur des trois isolats est différente (blanche, rouge et marron).

Le criblage des isolats par le test d'hydrolyse de l'amidon a permis de sélectionner les isolats de *Streptomyces* au tant que des souches productrices des amylases pour l'opération de l'extraction de cette protéine.

Les extraits enzymatiques bruts des souches obtenus présentent des concentrations 0,112 ; 0,184 et 0,565 mg/ml respectivement pour les trois isolats (S1, S2, S3).

L'étude de la cinétique révèle une variation dans les activités amyliques des extraits enzymatiques des trois souches. Le dosage des produits libérés au cours des différentes réactions présentent respectivement des valeurs supérieures de 1,38 et 1,043 μmol glucose /ml pour les isolats S3 et S2. En effet, les valeurs du K_m les plus faibles sont notées respectivement pour les souches de *Streptomyces* sp. S2 et S3 ($K_m = 0,19 \times 10^{-3}$ et $K_m = 0,15 \times 10^{-3}$) par rapport à l'isolat S1 ($K_m = 8,08 \times 10^{-3}$). Les valeurs des vitesses initiales sont de 0,006 ; 0,10 et 0,13 $\text{mol l}^{-1}\text{min}^{-1}$ respectivement pour les trois isolats (S1, S2, S3).

En fin, les résultats obtenus méritent une étude plus approfondie, dont il est souhaitable de:

- Purifier l'enzyme amylase et de la caractériser par les techniques telles que l'électrophorèse et HPLC, etc.
- Suivre la croissance des deux souches actinomycétale S2 et S3 sur milieu optimisé, pour déterminer leurs mécanismes de production de l'enzyme.
- Étudier les cinétiques des activités de l'amylase purifiée à des pH et températures différents pour des utilisations industrielles.



Références bibliographiques

Références bibliographiques

1. **Abbes S., et Bouteraa J., 2017.** Identification phénotypique de quelques isolats d'actinobactéries présentant une activité antimicrobienne vis-à-vis des microorganismes pathogènes. Thèse de M'SILA.
2. **Abdelmoughit E., 2017.** Activité antifongique des actinomycètes vis à vis de quelques espèces de levures. Thèse de fin d'étude Université Hassan I Maroc .
3. **Abderrahmane B., Zerizer H., Kitouni M., 2017.** Métabolites d'actinomycètes à intérêt agro-alimentaire : production de protéases, de lipases, de bactériocines, de phytohormones et de sidérophores. Researchgate. 2018.
4. **Agrar., 2013.** 1st conference of African research on agriculture, food, and nutrition. Yamoussoukro, Coté d'Ivoire, June 4-6.
5. **Aouiche A., Sabaou N., Meklat A., Zitouni A., Mathieu F., Lebrihi A., 2012.** Activité antimicrobienne de *Streptomyces* sp. d'origine saharienne contre divers microorganismes cliniques et toxigènes résistants aux antibiotiques. Journal de Mycologie Médicale : 22, 42-51.
6. **Eranga T., 2015.** Actinobacteria- Morphology, Physiology, biochemistry, diversity & Industrial Applications of genus Actinobacteria. Microbiology Special Degree -Assignment 2. Vol 10.13140.
7. **BADIS A., SABAOU N., DJIBAOU R., et SARAG M., 2006.** La diversité des actinomycètes de quelques sols sous orangerie de la Mitidja et la dégradation des acides humiques. Revue : La diversité des actinomycètes de quelques sols sous orangerie de la Mitidja et la dégradation des acides humiques. Vol :74-76.
8. **Beatriz R., María T López-G., Paula Y., Jesús S., and Ángel M., 2014.** Mycelium differentiation and development of *Streptomyces coelicolor* in lab-scale bioreactors: Programmed cell death, differentiation, and lysis are closely linked to undecylprodigiosin and actinorhodin production. journal Europe PMC Funders Group Author Manuscript. Vol. 151:10 :1016.
9. **Bhat M.K., 2000.** Cellulases and related enzymes in biotechnology. Journal of biotechnology Advances. Volume 18, Pp 355-383.
10. **Boughachiche F., Rachedi K., Duran R., Lauga B., Karama S., B Lynda., Boulezaz S., Boukrouma M., Boutaleb H., and Boulahrouf A., 2016.** Optimization of

alkaline protease production by *Streptomyces* sp. strain isolated from saltpan environment. african journal of biotechnology. Vol.15(26).Pp.1401-1412,29.

11. **Camille D., 2007.** Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyse ou de contrôle sanitaire. Edition Lavoisier Pp :156 ,
12. **Chaoui R., & Boursas I., 2015.** Purification partielle et caractérisation des protéases de fleurs de *Galactit est omentosus* Moench. thèse de Master Université les Frères Mentouri Constantine
13. **Cheriet M., Amari S., Benmammar Y., 2015.** Étude de quelques activités enzymatiques d'une collection d'actinomycètes.
14. **Collins T., Gerday C., Feller G., 2005.** Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. FEMS Microbiol. Rev. 29, 3-23.
15. **Das A., Hamedani K., Soudbakhsh M., Prashanthi K., Bhattacharya S., and Suryan S., 2012.** Enzymatic screening, antibacterial potential and molecular characterization of *Streptomyces* isolated from Wayanad District in Kerala, India. IJPBS, Volume 2, Issue 1 Pp 201-210.
16. **Dinesh K., Maheshwari., Meenu S., 2015.** Halophiles: Biodiversity and sustainable exploitation. Sustainable Development and biodiversity 6. Springer International Publishing Switzerland, 2015. PP43.
17. **Divya P., Neelu N., Mansi P., Manish B., Abul M., Madhukar K., and Balasaheb K., 2013.** Actinomycetes: A Repertory of Green Catalysts with a Potential revenue resource. Journal of BioMed Research International Volume, ID 264020, 8Pp.
18. **Dommergues Y., Mangenot F., 1970.** Écologie Microbienne Du Sol. Paris, Masson et Cie. Pp 23,27, 29.
19. **Essaid Ait B., Parul V., Lisa S., Nathalie G-V., Cedric J., Hans-P., Christophe C., Yder O., Gilles P. van W., (2016).** Taxonomy, Physiology, and Natural Products of Actinobacteria. Journal of Microbiology and Molecular Biology. Vol:80:1.
20. **Galatenko OA., Preobrazhenskaia T.P., Terekhova L.P., Borisova V.N., Fedorova G.B., 1982.** Distribution of *Actinomycetes* of the genus *Actinomadura* in the light chestnut soils of Volgograd Province and their antagonistic properties. Pubmed NCBI Antibiotiki. 27(11): 803-810.
21. **Geraldine S., Mala J., Satoru T., 2009.** Perspectives on Lipase Enzyme Technology .Pp 147

22. **Gerard M., Williams S.T., Mordarksi., 1988.** Actinomycetes in Biotechnology. Academic Press Limited, Pp 232.
23. **Gerois J., Gianotta F., De Buyl E., Garnier B., Frère J.M., 2000.** Purification and properties of three endo b-1-4 xylanases produces by *Streptomyces* sp. Strain S38. Enzyme Microb. Technol. 26, 178-186.
24. **Ghorbel Sofiane, Maher Kammoun, Hala Soltana, Moncef Nasri, and Noomen Hmidet., 2014.***Streptomyces flavogriseus* HS1: Isolation and Characterization of Extracellular Proteases and Their Compatibility with Laundry Detergents. journal of BioMed, 8 Pp.
25. **Goodfellow M., and Williams S.T., 1983.** Ecology of actinomycetes. Annual Review of Microbiology, 37, 189–216
26. **Gouse B., Sheik M., Sheriff M., Gokul S., Ranjith MS., 2017.** Isolation and characterization of actinomycetes from soil of ad-dawadmi, saudi Arabia and screening their antibacterial activities. International journal of pharmacy and pharmaceutical sciences. Vol:9.
27. **Haberra S., 2014.** Production, optimisation et étude de xylanases chez une nouvelle souche d'Actinomycète thermophile isolée du compost de poulet. diplôme de Doctorat Annaba. University de Badji Mokhtar
28. **Hitesh J., Nimita U., Darshan D., Manthan K., Shilpa S., and Jagdish P., 2016.** Isolation, Optimization and Production of Cellulase by *Aspergillus niger* from Agricultural Waste. Journal of pure and applied microbiology. Vol. 10(2), Pp. 1159-1166.
29. **Hotam S., Chaudhary., Jayprakash Y., Anju R., Shrivastava., Smriti S., Anil K.S., Natrajan G., 2013.** Antibacterial activity of actinomycetes isolated from different soil samples of Sheopur (A city of central India). J. Adv. Pharm. Technol. Res. Jun; 4(2): 118–123.
30. **Janaki T., 2017.** Enzymes From Actinomycetes. International Journal of ChemTechResarc.10(2): 176-182
31. **Jaune G. ,2011.** Les Bactéries leur monde et nous vers une biologie intégrative et dynamique. Edition Dunod. Pp32.
32. **Jean N., Guy Leyral., 2014.** Microbiologie Technique : Dictionnaire des techniques. Edition 2014. Pp 404, 270, 239, 283,
33. **CJ.C., Jean-P., Gérard C., Bernard F., 2004.** Flore microbienne intestinale: physiologie et pathologie digestives, John Libbey. Euro. text, Paris.Pp 71.

34. **Jean-M., and Michel A.,** 3^e édition revue et augmentée. WillyMatthey., Le sol vivant: bases de pédologie, biologie des sols. Pp37.
35. **Kalakoutskii L.V., Nina S., Agre., 1976.** Comparative Aspects of Development and Differentiation in Actinomycetes. Journal merican Society for Microbiology.Vol.40, N°. 2 .Pp. 469-524.
36. **Kar S., and Ray RC., 2008.** Statistical optimization of α -amylase production by *Streptomyces erumpens* MTCC 7317 cells in calcium alginate beads using response surface methodology. Pol. J. Microbiol 57: 49-57
37. **Khwaja S., Ram Prasad., Santosh K., and Manish D., 2011.** Visavadia.Isolation of soil thermophilic strains of actinomycetes for the production of α -amylase. .African Journal of Biotechnology Vol. 10(77), Pp. 17831-17836
38. **Khwaja S., Ram Santosh K., Manish D., and Visavadia ., 2011.** Isolation of soil thermophilic strains of actinomycetes for the production of α -amylase. African Journal of Biotechnology. Vol. 10(77),Pp. 17831-17836
39. **Kohli U., Nigam P., Singh D., Chaudharu K., 2001.** Thermostable alkalophilic and cellulose free xylanase production by Thermo actinomyces thalophilus sub group C. Enzyme Microbiol. Technol. 28, 606-610.
40. **Kolli N., Zatout R., 2015.** Production de l'alpha amyloses par certaines souches fongiques sur différents substrats. Thèse de Master Biotechnologie de mycètes université Constantine.
41. **Küster E., et Williams S.T., 1964.** Production of Hydrogen Sulfide by *Streptomyces* and Methods for its detection. Journal. American Society for Microbiology .Vol. 12, No. 1,Pp. 46-52.
42. **Laëtitia C., AntonioB., Marion Bardy., Dominique King., 2008.** Gestion durable des sols. Edition Quae. Pp : 06.
43. **Lakshmipathy D., Krishnan K., 2010.** Isolation and Characterization of Antagonistic Actinomycetes from Marine Soil. Journal of Microbial & Biochemical Technology.Vol (2)1 :001-006.
44. **Larreta-Garde V., 1997.** Enzymes en Agroalimentaire. Edition Lavoisier. Pp.179-361.
45. **Leclerc H., 1969.** Microbiologie Générale. 1^{ère} Edition Maisson. Pp25.
46. **Lemerini W., 2016.** Contribution à l'étude des paramètres cinétiques de l'ascorbate oxydase de courgette verte (*Cucurbita pepomedullosa*). Ébauche d'un capteur optique pour

le dosage de l'acide ascorbique. Mémoire Pour l'obtention du diplôme de Magistère en biologie, université Aboubekr Belkaid, Tlemcen, Pp 82.

47. **Louati D., Majdoub R., Selmani S., Achour N., Hannachi H., Abida H., 2017.** Cartographie de la salinité du sol au niveau du périmètre irrigué Zelba de la région de Mahdia (Sahel Tunisien). Larhyss Journal, n°30, Pp. 191-204.

48. **Meziani.A et Mahcene.H., 2017.** Activités hydrolases des souches fongiques : Production par fermentation de cellulase et d' α -amylase par *Penicillium. sp* sur substrat solide. Thèse de Master Biotechnologie des Mycètes. Université de Mentouri Constantine.

49. **Micah D., Shepherd., Madan K., Kharel., Mary A., Bosserman., and Jürgen Rohr., 2010.** Laboratory Maintenance of *Streptomyces* species. Pumed Journal. NIH Public Access.

50. **Mihaela C., Teodor Gh., Negoita., Gabriela E., Bahrim., Peter Stougaard., 2011.** Partial characterization of cold active amylases and proteases of *Streptomyces* sp. From antarctica. Brazilian journal of microbiology .Vol 42: 868-877

51. **Minotto E., Pasqualini M.L., Trindade O.M. and Van Der Sand S.T., 2014.** Enzyme characterization of endophyto-actinobacteria isolated from tomato plants. Journal of Advanced Scientific Research.5 (2): 16-23.

52. **Miyadoh S., 1997.** Digital Atlas of Actinomycetes 2 - Society for Actinomycetes Japan. Asakura Publishing Co., Ltd., Japan.

53. **Mouranche A., Costes C., 1985.** Les Hémicellulases. Dans: Hydrolases et dépolymérases, enzymes d'intérêt industriel. Eds. Gauthier-Villars, Paris, p.p.165-197.

54. **Mukhtar S., Ahmad Zaheer., Dalaq Aiysha., Kauser Abdulla Malik., and Samina Mehnaz., 2017.** Actinomycetes: A Source of Industrially Important Enzymes. Journal of Proteomics & Bioinformatics. Vol, 10: 316-319.

55. **Mukhtar S., Zaheer A., Aiysha D., Malik KA., Mehnaz S., 2017.** A Source of Industrially Important Enzymes. J. Proteomics Bioinform.10: 316-319.

56. **Naglaa H., Satoko N., Mohsen M.E., Hush N., Naznin HA., Masaharu K., Hammad, and Masafumi S., 2017.** Biocontrol Potential of an Endophytic *Streptomyces* sp. Strain MBCN152-1 against *Alternaria brassicicola* on Cabbage Plug Seedlings. Microbes Environ. Vol. 32, No. 2, 133-141.

57. **Navarre, Françoise I., 2010.** L'œnologie 7^e Edition.. Pp39 et 42.

58. **Neelun A., Abul M., Manish B., Sofiane G., and Divyab., 2013.** Actinomycetes: Role in Biotechnology and Medicine. Journal. Bio. Med. Research. International. Vol; 1Pg.
59. **Nicemol C., Asha P., Prem., 2008.** Purification and partial characterization of polygalacturonase from *Streptomyces lydicus*. Journal Bioresource Technology. Vol (99): 6697–6701.
60. **Palaniyandi S.A., Yang S.H., and Suh J.-W., 2013.** Extracellular proteases from *Streptomyces phaeopurpureus* ExPro13 inhibit spore adhesion, germination and appressorium formation in Colleto trichumcoccodes. Applied Microbiology.1364-5072.
61. **Pandey B., Ghimire P., Agrawal VP., 2004.** Studies on the antibacterial activity of the actinomycetes isolated from the Khumbu region of Nepal. Acad. Sci Technol, 4(3):1-4.
62. **Patricia Touyre., 2015.** Le Sol un monde vivant. Pp81, 85
63. **Patrick F., Jacqueline D. & Philippe T., 2008.** Les lipases sont des hydrolases atypiques : principales caractéristiques et applications. Vol 2.
64. **Pierre F., 2000.** Livre le grain de blé : Composition et utilisation. Edition Quae. Pp123,
65. **Praveen K.P., Preetam R.J., Nimal Christhudas I.V.S., Sagaya Jansi Murugan R., Agastian P., Arunachalam C., Sulaiman Ali Alharbi., 2015.**Screening Actinomycetes for Enzyme and Antimicrobial Activities from the Soil Sediments of Northern Tamil Nadu, South India. J.Taylor & Francis Group.2231-1866.
66. **Priyadharsini P., Dhanasekaran D., 2013.** Diversity of soil Allelopathic Actinobacteria in Tiruchirappalli district, Tamilnadu, India. Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences.14 :54-60
67. **Ragunathan R., Padhmas R., 2013.** Production, purification and characterization of - amylase using *Streptomyces* spp. PDS1 and *Rhodococcus* spp. Isolated from Western Ghats. Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci 2(8): 206-214.
68. **Rajeeva G., SoniT., 2015.**Isolation, production, purification and characterization of an organic-solvent-thermostable alkalophilic cellulase from *Bacillus vallismortis* RG-07.Journal of BMC Biotechnology.Vol15:19.
69. **RajeshMuthu M., Subbaiya R., Balasubramanian M., Ponnurugan P., Masilamani Selvam., 2013.** Isolation and Identification of Actinomycetes isopterocola variabilis From Cauvery River Soil Sample. Int.J. Curr. Microbiol. App.Sci :(6): 236-245.

70. **Rajshree S., and Rajni S., 2011.** Amylase production by solid-state fermentation of agro-industrial wastes using *Bacillus* sp. Brazilian Journal of Microbiology. Vol 42: 1334-1342
71. **Ramesh C., Rishi G., and Ajay S., 2011.** Microbial Cellulases and Their Industrial Applications. Journal of SAGE-Hindawi.10 pages.vol 10.4061.
72. **Ranjani A., Dhanasek., and Gopinath P., Manogaran., 2016.**an Introduction to Actinobacteria.Vol 10.5772/62329.
73. **Raoul Calvet., 2013.** Le Sol, 2^{ème} Edition. Éditions France Agricole. Pp 71
74. **Ripert Christian., 2013.** Mycologie médicale. Edition Lavoisier. Pp : 04.
75. **Ronald P., De Vries, Visser J., Leo H., de Graaff., 1999.** CreA modulates the XlnR-induce expression on xylose of *Aspergillus niger* genes involved in xylan degradation. Res. Microbiol. 150, 281-285.
76. **Rosilma O., Araujo- Melo., Igor F.A.C., Maria C.V., Janete M., Kêsia X.R.F., and Luana C. B. B. Coelho., 2016.** Actinobacteria : Versatile Microorganisms with Medical and Pharmaceutical Application. British Biotechnology Journal.vol 15(4).
77. **Sabaou N., 1988.** Contribution à l'étude des actinomycètes des sols des palmeraies algériennes: systématique et écologie. Thèse de Doctorat des Sciences Naturelles, option Microbiologie, USTHB, Alger. 192
78. **Saci A., 2012.** Production d'alpha-amylase par *Streptomyces* sp. Optimisation d'un milieu de production à base de déchets d'orange. Université Mentouri, Constantine .thèse de magister.
79. **Saci K., Safane A., 2015.** Isolement des souches d'actinomycètes d'un sol agricole contaminé par l'herbicide Apyros et étude de leur capacité à le dégrader.thèse de Master Microbiologie générale et Biologie Moléculaire des Microorganismes. Université de Constantine.
80. **Samain et Boucher., 1974.** Dosage automatique et simultané de l'amylase et des protéines du zooplancton. Ann. Inst. Oceanogr. Vol :50 (2), 199-205.
81. **Samrat C., Ghanshyam R., Abhijeet K., Kakasaheb M., and Chandrakant K., 2012.** Study on calcium ion independent α -amylase from haloalkaliphilic marine *Streptomyces* strain A3. Indian Journal of Biotechnology. Vol 11, pp 427-437.
82. **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.

83. **Stackebrandt E., and Schumann P., 2006.** Introduction to the taxonomy of Actinobacteria. Prokaryotes, 3, 297–321.

84. **Sudhanshu D., Ravindra., Vijay U., Sanjay K., 2011.** Isolation and Characterization of Actinomycetes Producing Antimicrobial Substance against Human Pathogenic Bacteria. Journal of Pharmacy Research. vol 4(11), 4066-4068.

85. **Taibi Z., Saoudi B., Boudelaa M., Trigui H., Belghith H., Gergouri A., Ladjama A., 2011.** Purification and biochemical characterization of highly thermostable xylanase from *Actinomadura* sp. Strain Cpt20 isolated from poultry compost. Appl. Biochem. Biotechnol. 011.9457

86. **Tanveer Pirzadah., Shashank Garg., Joginder Singh., Ashish Vyas., Manish Kumar., Naseem Gaur., MadhuBala., Reiaz Rehman., Ajit Varma., Vivek Kumar., and Manoj Kumar., 2014.** Characterization of *Actinomycetes* and *Trichoderma* spp. for cellulase production utilizing crude substrates by response surface methodology. Journal of Spirnger. Vol 3:622.

87. **Tifrit A., 2016.** Isolement et caractérisation des bactéries à intérêts biotechnologiques à partir de niches écologiques Algériennes. Thèse de Doctorat en Science de La Nature et de la Vie (Biologie). Université Hassiba Benbouali De Chlef.

88. **Toumatia Omrane., 2015.** Étude de quelques souches de *Streptomyces* des sols arides d'Algérie antagonistes de *Fusarium culmorum*: taxonomie, caractérisation des antibiotiques et essais de lutte contre la fusariose du blé. Thèse de doctorat en Microbiologie Appliquée. Ecole Normale de Kouba-Alger.

89. **Tresner H.D., and DANGA D.F., 1958.** Hydrogen sulfide production by *Streptomyces* as a criterion for species differentiation. Pubmed Bactériol. Vol 76(3):239-244.

90. **Valli S., Suvathi Sugasini S., Aysha OS., Nirmala P., VinothKumar P., Reena A., 2012.** Antimicrobial potential of Actinomycetesspecies isolated from marine environment. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine. 2(6): 469-473.

91. **Wiley V.C.H., 2017.** Industrial Biotechnology: Products and Processes., Pp 164.

92. **William B., Whitman., Michael Good fellow.,Peter Kämpfer., 2012.**Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Volume 5: The Actinobacteria, Pp1928.
93. **Won-Jae Chi .,Yoon-Hee Kim., Jong-Hee Kim., Dae-Kyung Kang., Sang-Soon Kang., Joo-Won Suh., and Soon-Kwang Hong., 2003.** *Streptomyces griseus* trypsin (SGT) has gelatinase activity and its proteolytic activity is enhanced by manganese. The Journal of Microbiology, Pp.289-294.
94. **Wood T.M., etBhat K.M., 1988.** Methods for measuring cellulase activities. Methods in enzymology. International Union of pure and Applied Chemistry. 87- 100.
95. **Xavier et Laurence., 1997.** Bactéries, virus et champignons. Edition Flammarion. Pp17.
96. **Zoubiri L., 2012.** Production d'alpha amylases par des moisissures cultivées sur milieu à base de rebuts de dattes. Thèse de Magister en Science Alimentaires. Université Mentouri-Constantine.



Annexes

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 ₃	2 g
K ₂ HPO ₄	0,02g
NaCl.....	2g
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	2 g
CaCO ₃	0,05 g
FeSO ₄ .7H ₂	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 dipotassique.....	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 ₂ HPO ₄	10g
Extrait de levure.....	05g
KCl.....	0.5g
MgSO ₄	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
- NaOH30g
- Iode de potassium1g
- H_2O : q.s.p.....1l

Résumé

Les amylases sont les principales enzymes impliquées dans la biodégradation de l'amidon. Ces enzymes possèdent divers applications industrielles. Dans cette étude, trois souches d'actinobactéries appartenant au genre *Streptomyces sp* ont été isolées à partir du sol de la région de Ouilis (Mostaganem), et caractérisés morphologiquement par des tests physiologiques et biochimiques. Les capacités des isolats à produire les amylases qui dégradent l'amidon ont été déterminées sur un milieu de culture riche en amidon. La sélection des souches productrices des amylases est établie par la mesure des diamètres des zones d'hydrolyses formées autour des cultures. La quantification et la cinétique des extraits enzymatiques ont été effectuées à des longueurs d'ondes $\mu = 540$ nm par des dosages colorimétriques.

Les résultats des caractérisations macro, microscopiques et les tests physiologique et biochimique confirment que les trois isolats d'actinobactéries appartiennent au genre *Streptomyces sp*. Les extraits enzymatiques bruts des souches présentent des concentrations 0,112 ; 0,184 et 0,565 mg/ml respectivement pour les trois isolats (S1, S2, S3). Le dosage des produits libérés au cours des différentes réactions d'hydrolyses des substrats présentent respectivement des valeurs supérieures de 1,38 et 1,043 μmol glucose /ml pour les isolats S3 et S2. Cependant, les valeurs du K_m , les plus faibles sont notées respectivement pour les souches de *Streptomyces sp*. S2 et S3 ($0,19 \times 10^{-3}$ et $0,15 \times 10^{-3}$) par rapport à l'isolat S1 ($8,08 \times 10^{-3}$). Les vitesses initiale (V_i) des réactions sont de 0,006 ; 0,10 et 0,13 $\text{mol l}^{-1}\text{min}^{-1}$ respectivement pour les trois isolats (S1, S2, S3). Les résultats obtenus méritent une étude plus approfondie, dont il est souhaitable de purifier l'enzyme amylase et suivre la croissance des deux souches actinomycétale sur milieu optimisé, pour déterminer leurs mécanismes de productions pour l'enzyme.

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

Abstract

Amylases are the main enzymes involved in the biodegradation of starch. These enzymes have various industrial applications. In this study, three strains of actinobacteria belonging to the genus *Streptomyces sp* were isolated from the soil of the region Abdelmalek Ramdan (Mostaganem), characterized morphological and physiological, biochemical tests. The abilities of starch degrading amylase by isolates were determined in a starch rich culture medium.

The selection of the amylase-producing strains is established by measuring the diameters of the hydrolysis zones formed around the cultures. Quantification and kinetics of the enzymatic extracts were carried out at wavelengths $\mu = 540$ nm by colorimetric assays. The results of the macro-microscopic characterizations and the physiological, biochemical tests confirm that the three isolates of actinobacteria belong to the genus *Streptomyces sp*. The crude enzymatic extracts of the strains have concentrations of 0.112; 0.184 and 0.565 mg / ml respectively for the three isolates (S1, S2, S3). The assay of the products released during the different hydrolysis reactions of the substrates have respectively higher values of 1.38 and 1.043 μmol glucose / ml for isolates S3 and S2. However, the K_m values are the lowest for *Streptomyces sp*. S2 and S3 (0.19×10^{-3} and 0.15×10^{-3}) relative to isolate S1 (8.08×10^{-3}). The initial velocities (V_i) of the reactions are 0.006; 0.10 and 0.13 $\text{mol l}^{-1}\text{min}^{-1}$ respectively for the three isolates (S1, S2, S3). The results obtained deserve further study, it is desirable to purify the amylase enzyme and monitor the growth of both actinomycetal strains on optimized medium, to determine their production mechanisms for the enzyme.

Keywords: *Streptomyces sp*, Amylase, K_m constant; initial velocity

المخلص

الأميلاز هو من الإنزيمات الرئيسية التي تشارك في التحلل البيولوجي للنشاء. هذه الإنزيمات لها تطبيقات صناعية متنوعة. في هذه الدراسة تم عزل ثلاث سلالات من البكتيريا المسببة للأمراض التي تنتمي إلى جنس *Streptomyces sp* السببية من تربة منطقة عبد المالك رمضان (مستغانم). يتميز هذا النوع بعدة أشكال اظهرت من خلال الفحوصات الفيزيولوجية والكيميائية الحيوية. تم تحديد قدراتها لتحليل النشاء على مستنبت غني بالنشويات. يتم تقييم نشاط الأميلاز وكمية الانزيم من خلال دراسة الأطوال الموجية = 540 نانومتر بواسطة المعايرة اللونية.

النتائج، والتوصيفات المجهرية والاختبارات الفيزيولوجية والكيميائية الحيوية تؤكد أن ثلاث عزلات الفطريات الشعاعية تنتمي إلى جنس *Streptomyces sp*. المستخلصات الأنزيمية التي أنتجتها السلالات لديها تركيزات 0.112 و 0.184 و 0.565 ملغ / مل على التوالي بالنسبة للعزلات الثلاثة (S1, S2, S3). اما كمية المنتجات المتحصل عليها خلال هذه التفاعل على التوالي: 1.38 μmol و 1.043 μmol من الجلوكوز لعزلات S3 و S2. اما قيم ثابت ميكاليس K_m هي الأدنى بالنسبة لـ للسلالة S2 و S3 (0.19×10^{-3} و 0.15×10^{-3}) بالمقارنة لسلالة S1 (8.08×10^{-3}). السرعات الابتدائية (V_i) لتفاعلات الإنزيمات في المحلول تساوي = 0.006 ؛ 0.10 و 0.13 مول في اللتر في الثانية بالنسبة للعزلات الثلاثة (S1, S2, S3).

النتائج التي تم الحصول عليها تستحق المزيد من الدراسة، من المستحسن على الوسط الأمثل لتنقية أنزيم الأميلاز ورصد نمو آليات إنتاجه في كل من سلالات الفطريات الشعاعية.

الكلمات المفتاحية: السببية الأميلاز، النشاء، ثابت ميكاليس k_m ، السرعة الابتدائية V_i .