



DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDES

Présenté par

Melle Zerrouki mokhtaria

Et Melle Bourada hanane

Pour l'obtention du diplôme de

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Spécialité: MICROBIOLOGIE APPLIQUEE

THÈME

Contribution à l'étude de quelques souches
d'actinomycètes productrices des amylases,
et détermination de leurs paramètres cinétiques
vis-à-vis de leur substrat spécifique

Soutenu publiquement le 10/07/2019

DEVANT LE JURY

Président Mr R. CHADLI

Grade Docteur Professeur

U. Mostaganem

Encadreur Mlle F. TISSOURAS

Grade : MCA

U. Mostaganem

Examineurs Mme W. SIDHOM

Grade : MCB

U. Mostaganem

Année universitaire 2018-2019

Remerciements

Avant toute chose, Nous tenons à remercier «Allah» qui m'a donné la force et la volonté pour terminer ce modeste travail.

*Nous tenons tout d'abord à remercier **Melle Tissouras Fatifa** Maître de Conférences à l'Université Abdelhamid Ibn Badis-Mostaganem, qui a bien voulu accepter de me prendre en charge pour réaliser ce modeste travail dont le mérite lui revient grâce à son aide à la fois matérielle et morale, ses conseils précieux et sa gratitude.*

*Nous tenons à remercier le Professeur Monsieur **Mr. R. CHADLI** pour m'avoir fait l'honneur d'accepter la présidence du jury, Qu'il trouve ici mes sincères impressions de gratitude et de respect.*

*Mes plus vifs remerciements vont à **Mme W. SIDHOM** Maître de conférences à l'université de Mostaganem pour avoir accepté d'examiner ce travail.*

Nous sommes honorées par sa participation au jury de cette mémoire. Nous tenons à remercier aussi les ingénieurs du laboratoire N°2 de la microbiologie et laboratoire N° 2 de la biochimie pour leur aide, ainsi que toutes les personnes qui ont participé à l'avancée de mon travail et à la réalisation des études expérimentales.

Enfin nous remercions ma famille surtout ma mère e et je remercie aussi tous mes amis.

Dédicace

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

*Avec l'aide du tout Puissant, j'ai pu réaliser ce modeste travail
que je dédie :*

*Les deux personnes, les plus chers au monde que je ne remercierais
jamais assez : leur aide, l'encouragement, Soutiens, sacrifices et leur
patience pendant toute ma vie : A*

Mes chers parents et ma grande mère

*Mes chères sœurs : Fatima, Charifa, Karima, Halima, Khalida, Noura
et Kheira*

Mes chers frères : Noureddine, Lakhal et Taruke

Toutes mes chères amies : Fatima, Mokhtaria, Souaad, Nadia et Sihem

*Mes chères amis de la promotion de master de parcours
microbiologie appliquée en témoignage de l'amitié qui nous unit et des
souvenirs de tous les moments que nous avons passés ensemble, je vous
souhaite une vie pleine de santé et de bonheur.*

*Tous les étudiants, enseignants et personnels du département des
Sciences Biologique.*

hanane

Dédicace

À MES CHERS PARENTS

*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, bien que je ne vous
En acquitterai jamais assez.*

*Puisse Dieu, le Très Haut, vous accorder santé, bonheur et longue
vie et faire en sorte que jamais je ne vous déçoive.*

A MA GRAND MÈRE CHÈRE

*Qui m'a accompagné par ses prières, sa douceur, puisse Dieu lui prêter
longue
vie et bq de santé et de bonheur dans les deux vies*

À MES SEURS : mansouria , nacera

À MES FRÈRES : hamide mansour

À Ma cher cousin : mohammed

*À MES AMIS DE TOUJOURS : hanane , souad , nadia
,sihem ,romayssa .*

*En souvenir de notre sincère et profonde amitié et des moments
Agréables que nous avons passés ensemble.*

Mokhtaria

Liste des abréviations

DO : Densité optique

K_m : Constante de Michaelis

N(I) et R(II) : Réactif de Greiss de Test nitrate réductase

P/V : poids sur volume

RM : rouge de Méthylène

S : souche

TSI : Triple sugar Iron.

V_{max} : Vitesse Maximale d'oxydation

V_i : Vitesse initiale d'oxydation

VP : Vosges – prokauer

Liste des tableaux

N°	Titre	page
Tableau 1	Nombre de microorganismes par 1g/sol en fonction de la profondeur	06
Tableau 2	Fréquence des divers genres d'Actinomycètes dans le sol	09
Tableau 3	Caractérisations macroscopiques des isolats d'actinobactéries	21
Tableau 4	Les Tests physiologiques et biochimiques des isolats d'actinomycètes	23
Tableau 5	Paramètres cinétiques des extraits d'enzymes des isolats de <i>Streptomyces</i> sp	33

Table des matières

Introduction	01
---------------------------	----

Partie 1 : Etude bibliographique

Chapitre I : Aperçu bibliographique sur le sol

1. Définition du sol	02
2. Les composants du sol	02
2.1. La phase solide du sol.....	03
2.2. La phase liquide du sol.....	03
2.3. La phase gazeuse du sol.....	03
3. Les facteurs influençant l'activité du sol	04
3.1. Les facteurs physiques.....	04
3.2. Les facteurs chimiques.....	05
3.3. Les facteurs climatiques.....	05

Chapitre 2 : II. Aperçu bibliographique sur la microflore

1. Définition.....	06
2. Les microorganismes du sol.....	06
2.1. Les algues.....	06
2.2. Les protozoaires.....	06
2.3. Les levures.....	07
2.4. Les virus.....	07
2.5. Les champignons.....	07
2.6. Les bactéries.....	07
3. Actinobactéries.....	07
3.1. Classification des actinomycètes.....	08
3.2. Physiologie et écologie.....	08
3.3. Distribution dans la nature.....	09
3.4. Cycle de développement.....	09
4. Importance des actinomycètes.....	10
4.1. Dans le domaine médical et vétérinaire.....	10
4.2. Dans le domaine industriel.....	11
4.3. Dans le domaine agronomique.....	11

Partie 2 : partie expérimentale

Chapitre III : Matériel et méthodes

1. L'objectif.....	12
2. Protocol expérimental général.....	12
2.1. Sites de prélèvement de l'échantillon.....	12
2.2. Isolement des actinomycètes.....	13
2.3. Purification et conservation des isolats.....	14
2.4. Identification des actinobactéries.....	14
2.4.1. Caractérisations macroscopiques.....	14
2.4.2. Caractérisations microscopiques.....	14
2.4.3. Les tests biochimiques.....	15
2.4.3.1.Hydrolyse de l'amidon.....	15
2.4.3.2.Hydrolyse de la caséine.....	15
2.4.3.3.Hydrolyse de la gélatine.....	15
2.4.3.4.Hydrolyse de lécithine et lipase.....	15
2.4.3.5.Utilisation de citrate comme une seule source de carbone.....	16
2.4.3.6.La réduction des nitrates.....	16
2.4.3.7.Les recherches de catalase.....	16
2.4.3.8.Les recherches de l'uréase.....	17
2.4.3.9.Les tests TSI.....	17
2.4.3.10. Les réactions VP et RM.....	17
3. L'activité enzymatique.....	17
3.1. Préparation d'inoculum pour la fermentation.....	17
3.2. Extraction chimique des amylases.....	18
3.3. Étude de la cinétique des extraits enzymatiques.....	18
3.3.1. Préparation de la gamme d'étalonnage d'ovalbumine par la méthode de biuret.....	18
3.3.2. Préparation de la gamme d'étalonnage du glucose.....	18
3.3.3. La cinétique des extraits enzymatiques.....	19

Chapitre IV : Résultats et Discussion

1. Isolement des Actinomycètes.....	21
2. Identification morphologique des souches d'actinomycètes.....	21
2.1. Identification macroscopique.....	21
2.2. Etude microscopique.....	22
3. Tests physiologiques et biochimiques.....	23
3.1. Hydrolyse de l'amidon.....	24

3.2.	Hydrolyse de caséine.....	24
3.3.	Hydrolyse de la gélatine.....	25
3.4.	Hydrolyse de la lécithine.....	25
3.5.	Réduction des nitrates.....	26
3.6.	Recherche de Catalase.....	26
3.7.	Dégradation de l'urée.....	27
3.8.	Test TSI.....	27
3.9.	L'utilisation de citrate.....	28
3.10.	Les réactions de VP et RM.....	28
4.	Production des extraits enzymatique des isolats <i>Streptomycètes sp.</i>	29
4.1.	Dosage des extraits enzymatiques par la réaction de Biuret.....	29
4.2.	Mesure des paramètres cinétiques des extraits d'amylasiques des isolats <i>Streptomycètes sp.</i>	30
4.3.	Mesure des paramètres cinétiques.....	31
	Conclusion et perspectives	35
	Références bibliographiques	36
	Annexe	40
	Résumé	

Introduction

Introduction

Les Actinobactéries jouent un grand rôle dans les différents domaines l'écologique, agriculture, industriel et économique. Ce sont des microorganismes à multiples fonctions, ils contribuent dans les cycles géochimio-pédologiques. Ils se comportent beaucoup comme des champignons par leurs systèmes de développement sous formes des mycéliums ramifiés. Ce sont des bactéries à Gram positif, ils peuvent être terrestres ou aquatiques. D'après **Mukhtar et al. (2018)**, Les actinomycètes produisent de nombreuses enzymes extracellulaires précieuses qui peuvent décomposer une variété de matières organiques. Les enzymes produites par Actinomycètes sont appliquées dans les différentes industries telles que les cellulases, les protéases, les xylanases, les lipases, les chitinases , les pectinases et les amylases. Ils jouent un rôle clé en tant que biocatalyseurs des réactions métaboliques. Les actinomycètes forment un groupe important de populations microbiennes dans le sol, vu leurs importances industriels le travail a porté sur la sélection de quelques espèces d'actinomycètes productrices des amylases. Cependant, des étapes multiples ont été suivies avec quelques objectifs afin de réaliser ce travail, les principales étapes sont :

- Isolements et purification des actinomycètes à partir des échantillons du sol forestiers, de la région de la Mostaganem.
- Identification des isolats sélectionnés sur la base des critères morphologiques, physiologiques et biochimiques.
- Production et extraction des extraits d'amylases d'origine bactérienne, poursuivie d'une mise en évidence de leurs cinétiques enzymatiques.
- Présentation des résultats et leurs discussions, jointes d'une conclusion générale et des perspectives

Partie bibliographique

Chapitre I :

Aperçu

bibliographique sur

le sol

I. Aperçu bibliographique sur le sol

1. Définition du sol

Le sol est un environnement où cohabitent les êtres vivants (racines des végétaux, les animaux et les microorganismes). Selon **Arpin *et al.* (1980)**, c'est un assemblage complexe de substances minérales et organiques de gaz et de l'eau, à l'intérieur duquel se déroulent simultanément des phénomènes de dégradation et de synthèse. Cette hétérogénéité du sol a des particularités biologiques et biochimiques très diverses. L'activité de ces populations est influencée par divers facteurs (température, pH, profondeur du sol, humidité et présence des substances organiques et inorganiques). Les microorganismes présents dans le sol sont impliqués dans les cycles de nombreux éléments chimiques (carbone, azote, phosphore, soufre, du fer et d'autres). Ils sont impliqués aussi dans la formation et la dégradation de l'humus et jouent un rôle important dans la solubilisation des composants organiques et inorganiques inaccessibles aux plantes (**Quénéa, 2004 ; Arpin *et al.*, 1980**).

2. Les composants du sol

Le sol est un milieu composé de plusieurs phases, solide, liquide et gazeuse (fig. 1). C'est un milieu structuré et son organisation influe directement sur l'ensemble des propriétés du sol. Elle dépend aussi des interactions bio-organo-minérales.

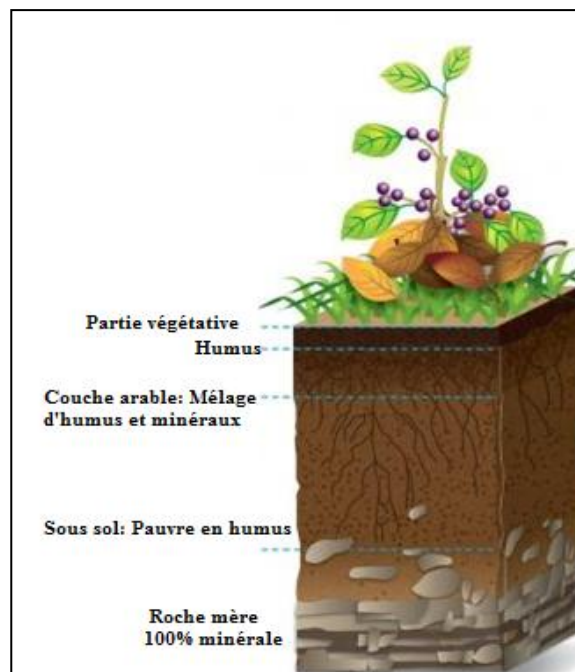


Fig. 1 : Schéma d'un profil de sol d'un végétal.¹

2.1. La phase solide du sol

D'après **Clavet, (2003)**, cette phase est constituée par des minéraux (95 à 99% du sol) et des matières organiques en proportions variables. On peut considérer que les organismes vivants du sol font partie de la phase solide puis qu'ils ne sont ni gazeux ni liquides. Les constituants minéraux du sol sont primaires, issus directement de l'altération et la transformation chimique de la roche mère ou secondaires. Elle comporte des sels (ex. carbonates de calcium ou de magnésium) ou des silicates (ex. Argiles), des colloïdes (hydroxydes de fer ou d'aluminium) et d'autres minéraux secondaires (**Gobat, 2003**).

La texture d'un sol correspond à la répartition des minéraux par catégorie de grosseur. Les sols sont classés suivant leurs proportions relatives selon les tailles granulométriques des particules argileuses, limoneuses et sableuses (**Atlas et Bartha, 1992**)

- Sable ($\varnothing = 50$ à $2000 \mu\text{m}$)
- Limon ($\varnothing = 2$ à $50\mu\text{m}$)
- Argile granulométrique ($\varnothing < 2\mu\text{m}$)

Concernant constituants organiques (l'humus), la phase solide contient les produits de décomposition partielle des végétaux, ainsi certaines matières végétales peu dégradables comme la lignine ou les acides humiques (fig. 1) (**Jerome et al. 2004**). La fraction organique d'un sol est constituée à plus de 80% de matière organique morte (résidus de plantes et d'animaux en état de décomposition naturelle) (**Paul et Clark, 1996**). Les bactéries et les champignons constituent les microorganismes les plus représentés dans la phase solide où ils sont les principaux responsables de la minéralisation des matières organiques (**Quénéa , 2004**). Ils participent aussi à un processus appelé humification qui conduit à la formation de l'humus qui est un composé complexe et majeur du cycle de la matière organique tellurique et de la fertilité du sol (**Paul et Clark, 1996**)

2.2. La phase liquide du sol

La phase liquide du sol est une solution dont la composition est complexe et très variable appelée souvent « solution du sol » (**Calvet, 2003**). La teneur globale en eau d'un sol est soumise à des changements très rapides en fonction des précipitations, de l'évapotranspiration et des remontées capillaires (fig. 1) (**Gobat, 2003**).

2.3. La phase gazeuse du sol

La phase gazeuse du sol est encore appelée atmosphère du sol sa composition est souvent voisine de celle de l'air, mais elle peut être très variable dans l'espace et dans le temps. Elle

dépend principalement de deux facteurs, la proximité de l'atmosphère, c'est-à-dire la profondeur dans le sol et l'activité biologique (Clavet, 2003).

Remarque : D'après (Bonell et al, 1981). Il existe un grand nombre de types des sols, parmi les quels les sols bruns, les sols rouges, les sols iso humiques et les sols ferralitiques etc. On considère qu'un bon sol agricole est constitué de 25 % d'eau, 25 % d'air, 45 % de matière minérale et de 5 % de matière organique.

3. Les facteurs influençant l'activité du sol

3.1. Les facteurs physiques

Les facteurs physiques influençant la qualité du sol sont la texture et la structure. La texture du sol intervient de deux façons : directe par l'action de différentes fractions minérales ou indirecte par son rôle majeur dans la genèse de la structure du sol. Dans un sol sableux riche en humidité, assure une propagation rapide de l'activité microbienne. Cette propagation est ralentie par la présence d'argile. L'action directe des particules argileuses a un effet protecteur des substances organiques par formation de complexes organo-minéraux moins accessibles à l'activité microbienne (Morel, 1989).

Concernant la structure du sol, les particules du sol maintenues ensemble par des forces physiques et chimiques forment des agrégats. L'absence ou la présence ainsi que la forme de ces agrégats définissent le type de structure (fig. 2) (Girard et al, 2005). Ainsi que, la qualité structurale du sol est fortement influencée par la valeur du pouvoir d'oxydo-réduction de ce sol (Morel, 1989).

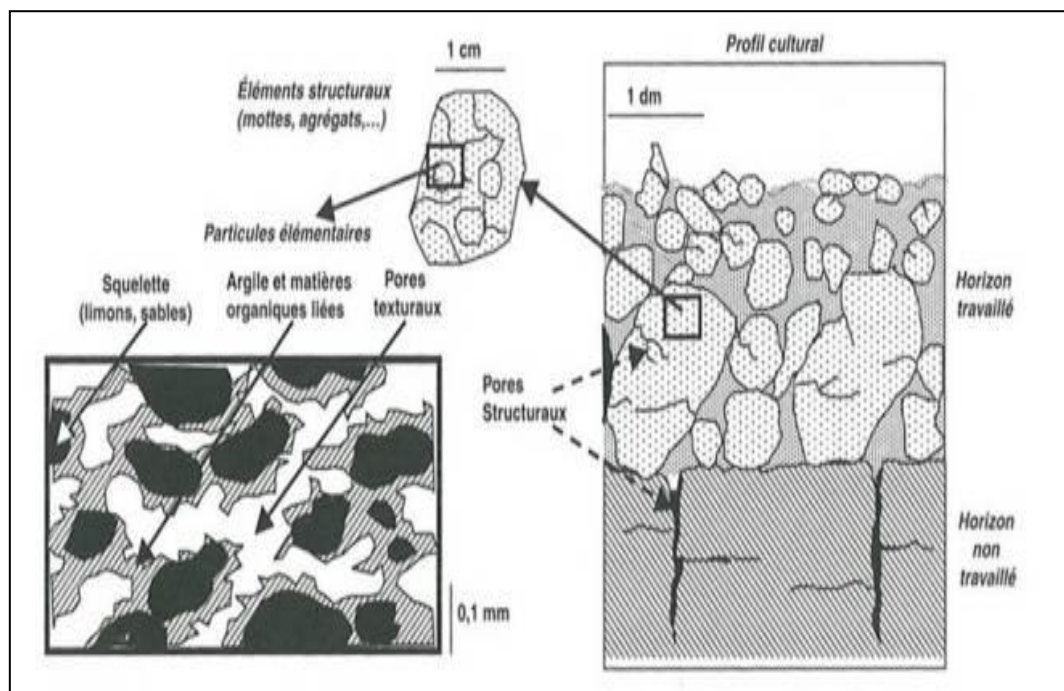


Fig.2 : Schéma d'Observation de la porosité à différentes échelles (Girard et al, 2005)

3.2. Les facteurs chimiques

Les facteurs chimiques regroupent la réaction du sol aux différents pH la salinité. D'après **Boullard et Moreau, (1962)**, l'ensemble des processus biologiques surtout la nitrification et la réduction de la respiration des sols salés constituent pour les microorganismes telluriques, un milieu défavorable en raison de la présence d'ions toxiques ; du pH parfois très basique ; du taux de la salinité de leur tension osmotique parfois élevée. L'inhibition de l'activité biologique par les sels se traduit par une forte teneur en composés hydrosolubles très mobiles (**Dellal et Halitim, 1992**). La variation d'acidité du sol présente un facteur limitant pour le développement des germes. Certains genres bactériens tels que les actinomycètes sont très sensibles aux variations du pH, ils favorisent des milieux proches de la neutralité. Contrairement aux champignons qui préfèrent un pH acide (**Boullard et Moreau, 1962**). Toutefois, l'évolution de la microflore du sol est influencée par le taux de la salinité, l'augmentation de ces taux peut diminuer le nombre de microorganismes (**Maameri, 2007**).

3.3. Les facteurs climatiques

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

Les sols secs ne présentent qu'une activité microbienne faible, mais lorsque cette teneur augmente, l'activité des microorganismes augmente progressivement jusqu'à un maximum, puis elle décroît (**Morel, 1989 ; Karabi, 2010**). Selon **Sltenner, (2005)**, un excès ou un manque d'eau ralenti ou inhibent le développement la vie de la microflore, il est nécessaire aussi à leurs déplacements. La température du sol représente aussi un facteur écologique très important qui influe la multiplication et la l'activité des microorganismes (**Sasson, 1967**). Pour chaque activité microbienne existe un seuil de température. Un optimum de température, au-dessous ou au-dessus du seuil correspond respectivement à une activité maximale ou nulle (**Morel, 1989**).

Chapitre II :
Aperçu
bibliographique sur
La microflore

II. La microflore du sol

I. Définition

Le sol représente un support de vie et des réserves de molécules simples et complexes telles que les vitamines, les hormones, les antibiotiques, les enzymes, etc. pour l'être humain ou pour les microorganismes (**Dommergues et Mangenot, 1970**). Une diversité de vie existe dans le sol grâce à la présence des microorganismes (bactéries, des champignons, des algues), des racines souterraines des plantes ainsi que des insectes et animaux très variés (des protozoaires aux mammifères). Il est intéressant de noter que plus de 90% de la biomasse des sols sont constitués par les organes souterrains végétaux principalement les racines (50%), et la microflore (41,7%) (**Calvet, 2003**). Tous participent d'une manière ou d'une autre à la formation et à l'évolution du sol, en particulier de sa fraction organique (**Gobat, 2003**).

2. Les microorganismes du sol

2.1. Les Algues

Les Algues sont des organismes phototrophes, présentent des différences significatives par rapport aux bactéries ou aux champignons (**Dommergues et Mangenot, 1970**). Les algues peuvent se contenter de faibles intensités lumineuses, ce qui leur permet d'avoir un comportement autotrophe actif à plusieurs millimètres au-dessous de la surface, notamment, dans les sols riches en particules de quartz translucides. Ainsi, le nombre diffère selon les profondeurs (tab. 1).

Tableau 1: Nombre de microorganismes par 1g/sol en fonction de la profondeur (**Alexander, 1991**).

Profondeur (cm)	Bactéries	Actinomycètes	Mycètes	Algues
3 à 8	2750000	2080000	119000	25000
20 à 25	2179000	545000	50000	5000
35 à 40	570000	49000	400000	500
65 à 75	11000	5000	6000	100
135 à 145	1400	-	3000	-

2.2. Les Protozoaires

Plusieurs espèces de protozoaires du sol se montrent très ubiquistes et se retrouvent dans des conditions climatiques très différentes. Ils ont une préférence pour les sols acides, cependant, il existe des espèces exclusivement calcicoles (**Davet, 2003**).

2.3. Les levures

Les levures sont peut nombreuses dans le sol. Il renferme des populations de levures variables suivant son type, caractéristiques et la végétation qu'il porte. Cependant les lois de leur répartition ou de leurs éventuelles fluctuations saisonnières sont encore imparfaitement connues. Les Levures sont abondantes dans les sols riches en matière organique fraîche ou peu décomposée et peut-être plus encore dans les litières forestières (**Dommergues et Mangenot, 1970**)

2.4. Les virus

A coté des microorganismes qui sont visible au microscope optique, le sol renferme d'autres sub-microscopiques dont l'existence ne peut être démontrée que par la microscopie électronique. Il s'agit essentiellement des virus, lorsqu'ils sont libres et placés hors d'une cellule vivante et à la lumière, ils sont rapidement inactivés. Une fois ils sont adsorbés peuvent conserver longtemps leur pouvoir infectieux (**Davet, 2003**).

2.5. Les champignons

La biomasse fongique est très variable abondante suivant les cas des sols. On peut l'estimer à environ entre 120 Kg/ha à plus d'une tonne dans les sols normaux (**Dommergues et Mangenot, 1970**). Leurs activités métaboliques sont multiples et fondamentales à l'équilibre écologique des sols. De nombreux travaux indiquent une prédominance des espèces : *Mucor*, *Trichoderma* et *Aspergillus*, alors que *Rhizopus*, *Fusarium*, *Zygorhynchus*, *Cephalosporium*, *Cladosporium* et *Verticillium* (**Noumeur, 2008**).

2.6. Les bactéries

Les bactéries sont les microorganismes les plus abondants et métaboliquement les plus actifs du sol. D'ailleurs, tous les groupes les bactéries connus sont isolés des échantillons de sol, à l'exception de ceux des milieux adéquats sont utilisés (**Dommergues et Mangenot, 1970**). De ce fait, accéder à la diversité bactérienne de manière exhaustive constitue un des défis majeurs de ces dernières décennies en écologie microbienne et les techniques qui y sont dédiées n'ont cessé d'évoluer (**Theodorakopoulos, 2013**). Leurs nombre varient selon le sol et les profondeurs (tab. 1).

3. Les actinomycètes

Les actinomycètes constituent l'ordre des actinomycétales. Ce sont des bactéries filamenteuses, septées, ramifiées, prenant généralement de Gram positive, le mot «Actinomycètes» provient de deux substantifs grecs « Actino » et « Mycète » et signifie «champignons à rayon» ou «champignons rayonnants», expression utilisée pour désigner en anglais (Ray fungi). Elles croissent en l'espace de quelques jours à quelques semaines. Elles

sont abondamment distribuées dans la nature. Les actinomycètes sont importants en raison surtout de leur rôle dans la fertilisation des sols, synthèse de composés complexes comme les antibiotiques, les vitamines, les stérols, etc. Les actinomycètes n'ont pas de membrane nucléaire, elles possèdent des organites flagellaires rassemblant à ceux des bactéries. Elles sont, pour la plupart, sensibles au lysozyme et aux agents antibactériens ; le diamètre de leurs hyphes est plus petit que celui des champignons (**Kitouni, 2007**).

En effet, ils, présentent des similitudes avec les Eubactéries et avec les champignons. Toutefois, il existe donc une transition entre les formes mycéliennes typiques et les formes unicellulaires, présentant une aptitude peu marquée à former un mycélium ramifié. Ils sont sensibles à certains antibactériens mais pas aux antifongiques (**Dommergues et Mangenot, 1970 ; Larpent et al, 1989 ; Aouar, 2006 ; Loqman, 2009**). Certains actinomycètes sont capables de se développer à des températures élevées et de produire des enzymes actives dans des conditions acides, d'autres sont des symbiotes de plantes (**Ensign et al, 1993**).

3.1. Classification des actinomycètes

Les Actinomycètes appartiennent au règne des *Procaryotes* (organismes cellulaires sans noyau), la division des *Firmicutes* (Bactéries Gram-positif) et à la classe des *Thallobacteria* (ramifiées) contenant l'ordre des *Actinomycetales* ; cette classification a été décrite par *Bergey's*, (1989), dans son Manuel *Systematic Bacteriology* (1986, 1989),

Durant les 30 dernières années, cette classification a évolué en fonction du développement des connaissances, cela a été marqué des nouveaux critères de classification, où sont regroupés en quatre périodes **Goodfellow et Williams, (1983)**:

- La période classique, où seuls les critères macro et micromorphologiques, permettaient de différencier les genres entre eux ;
- La période d'utilisation de la chimio-taxonomie. la chimio-taxonomie est l'utilisation des caractères chimiques des cellules (les acides aminés pariétaux, les lipides des enveloppes cellulaires et les sucres cellulaires) ;
- La dernière période combinaison de l'outil informatique à de nombreux tests physiologiques pour différencier entre les espèces de chaque genre.

3.2. Physiologie et écologie

Physiologiquement et écologiquement, il existe deux groupes d'actinomycètes. En premier lieu, les formes fermentatives, anaérobies strictes ou facultatives, illustrées par le genre *Actinomyces*. Ces organismes sont des saprophytes des cavités buccales naturelles de l'homme et des animaux supérieurs et ils ne sont jamais retrouvés dans le sol. Contrairement, les formes oxydatives, aérobie, tels que les *Streptomyces*, le sol reste leur réservoir principal

est peuvent disséminées par leurs spores dans l'air. Certains genres d'actinomycètes sont des chimio-organotrophes, mais plusieurs espèces sont capables aussi de croissance chimio-autotrophiques (Reponenet *al.*, 1998 ; Mariat et Sebald, 1990).

3.3. Distribution dans la nature

Les Actinomycètes sont adaptés à divers milieux écologiques (sols, les eaux douces ou salines et dans l'air). Toutefois, ils sont abondants dans les sols alcalins et les sols riches en matière organique où ils constituent une part importante de la population microbienne (Loqman, 2009) (tab. 2).

Tableau 2: Fréquence des divers genres d'Actinomycètes dans le sol (Lechevalier et Lechevalier, 1967).

Genre	Pourcentage %
<i>Streptomyces</i>	95,34
<i>Nocardia</i>	1,98
<i>Micromonospora</i>	1,4
<i>Thermomonospora</i>	0,22
<i>Actinoplanes</i>	0,20
<i>Microbispora</i>	0,18
<i>Mycobacterium</i>	0,14
<i>Streptosporangium</i>	0,10
<i>Actinomadura</i>	0,10
<i>Micropolyspora</i>	0,10
<i>Pseudonocardia</i>	0,06
<i>Microellobosporia</i>	0.04

3.4. Cycle de développement

Les *Streptomyces* ont un cycle de développement complexe qui se divise en plusieurs étapes. Il débute par la germination d'une spore qui donne naissance à un mycélium primaire formé d'hyphes non septes et plurinucléés, ramifiés et ancrés dans le milieu solide. En effet ce dernier s'autolyse et les produits de la lyse sont cannibalisés par le mycélium aérien. Les extrémités des hyphes aériens se prennent la forme spirale, puis se cloisonnent et se différencient pour former des chaînes de spores uninucléées (fig.3).

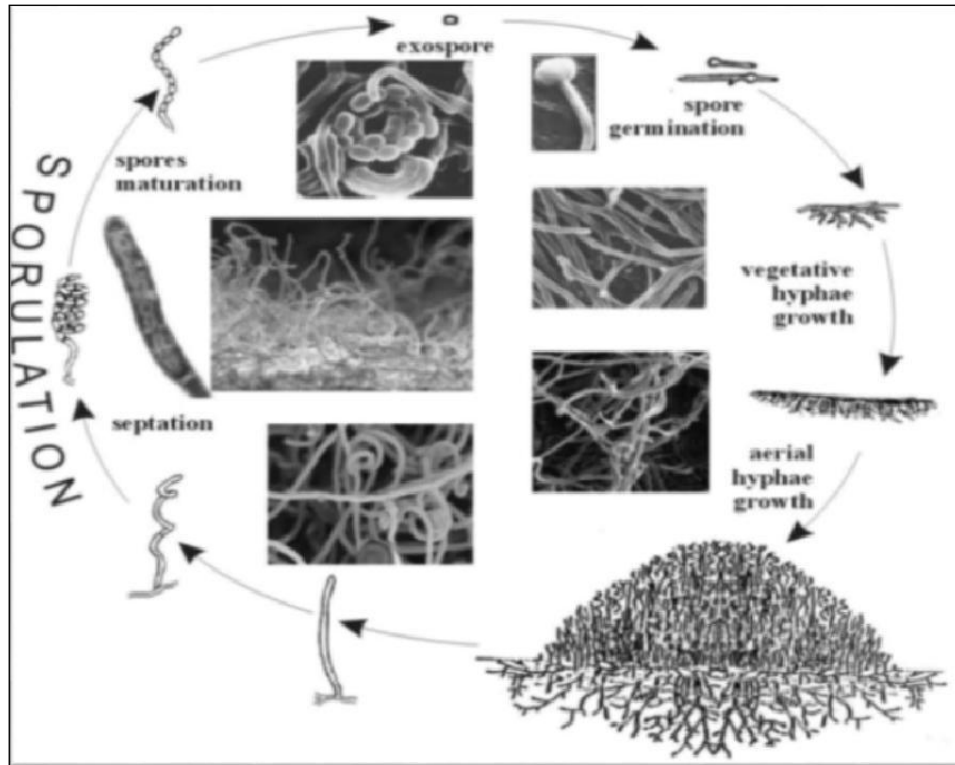


Fig.3 : Cycle de développement des *Streptomyces* sur milieu solide (Jakimowicz, 2007).

3.5. Classification scientifique

Selon [Waksman et Henrici, \(1943\)](#)² les streptomycètes sp présentent une diversité d'espèce d'environ environ 500 espèces, ce genre appartient au taxon suivant :

- Règne: Les bactéries
- Phylum: Actinobactéries
- Classe: Actinomycètes
- Ordre: Actinomycetales
- Famille: Actinomycetaceae
- Genre: *Streptomyces*

4. Importance des actinomycètes

4.1. Dans le domaine médical et vétérinaire

Parmi les genres actinomycétales, les *Streptomyces* sont les plus importants producteurs d'antibiotiques et autres métabolites secondaires (75%) (Reval, 2012). Les antibiotiques des actinomycètes sont utilisés dans le traitement de certaines maladies des plantes, par exemple : La blasticidine est active sur les pathogènes du riz (*Piriculariaoryzae*). Les pramicidines, par exemple sont des antifongiques synthétisés par une souche d'*Actinomadura bibisca*, ils sont aussi utilisés dans le traitement des maladies humaines et très actives contre des infections

systémiques fongiques (Tuomela *et al*, 2000). En plus les antibiotiques antimicrobiens des actinomycètes sont une source de substances antitumorales (actinomycine), miticide (tétranactine), antihelminthiques (avermectines), et de substances ayant des activités biologiques les plus diverses (immunosuppressives, immunostimulantes).

4.2. Dans le domaine industriel

De très nombreux métabolites bioactifs sont synthétisés par les actinomycètes tels que les enzymes. Certaines sont utilisées dans l'industrie alimentaire (isomérase du glucose) et l'industrie des détergents (protéases). Les glycosidases jouent un rôle important dans la dégradation des biomasses végétales (amylases et xylanases) et animales (chitinases). D'autres enzymes peuvent avoir des applications médicales (neuraminidases, estérases et oxydases des stéroïls) (Tsujiro *et al*, 2003).

Les amylases sont considérées comme un groupe important d'enzymes hydrolysant l'amidon en sirops à teneur élevée en fructose, glucose et maltose, ils peuvent être classés en endoamylases et exoamylases. Les *Streptomyces erumpens* et *Thermobifidafusca* ont la capacité à sécréter des amylases à l'extérieur des cellules pour effectuer les digestions extracellulaires. Des espèces de *Streptomyces* produisent des amylases, des cellulases et des hémi-cellulases.

Les lipases sont aussi produites par certaines souches actinomycétales, ces enzymes catalysent l'hydrolyse des triglycérides en diglycérides, en monoglycérides, en glycérol et en acides gras (Desouza *et al*, 2010)

4.3. Dans le domaine agronomique

Les actinomycètes sont considérés comme des biofertilisateurs des sols. Ils possèdent d'autres potentiels intéressants tels que leur implication dans le processus de recyclage. En effet, ces microorganismes sont aussi utilisés en bio-remédiation (le recyclage des nutriments). Ils sont aussi capables de dégrader des hydrocarbures chlorés ainsi que des composés organiques complexes. D'autres genres d'actinomycètes forment des interactions symbiotiques avec les racines de certaines plantes sous forme de nodule pour fixer l'azote et le transformer en éléments assimilable par les plantes (*Frankia*) (Fickers *et al*, 2008)

Chapitre III :
Matériel et méthodes

III. Matériel et méthodes

1. L'objectif

L'objectif principal de notre travail est focalisé sur l'isolement et l'identification de quelques souches des actinobactéries du genre *Streptomyces* sp du sol forestier de la région d'Abd-El-Malak Ramdhan (Mostaganem). Ces *Streptomyces* sp vont être sélectionné et caractérisé par des tests physiologiques et biochimiques dans le but de les utilisés pour la production des amylases.

2. Protocol expérimental général

La figure ci-dessous résume les principales étapes du protocole général suivi durant le travail.

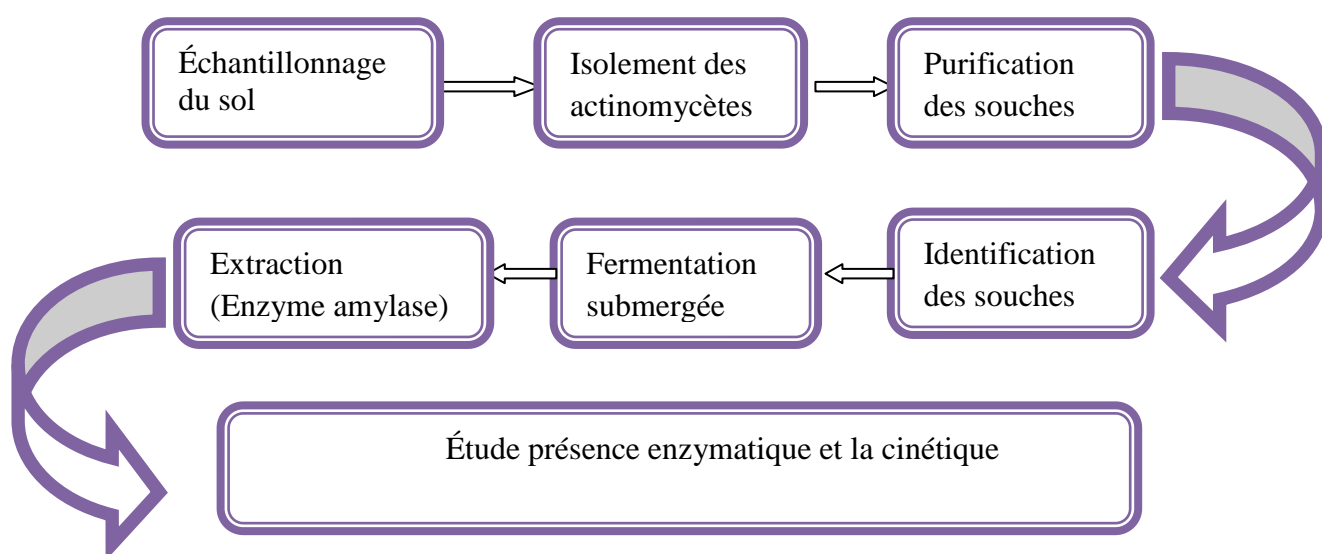


Fig. 4: Protocole expérimental générale.

2.1. Sites de prélèvement de l'échantillon

Le choix du site des prélèvements des échantillons a porté sur des sols forestiers de la région Abd-El-Malek Ramdane de la wilaya de Mostaganem (fig. 5). Cette région est située à 36° 06' 12" Nord et 0° 16' 34" Est, il présente une superficie de 75 km². La température journalière est de 21°C avec une humidité de 40 %. Les prélèvements ont été effectués le 10 février 2019.

Les échantillons sont prélevés aseptiquement à une profondeur d'environ 25 cm. Les sols ont été placés dans des sacs stériles. Chaque échantillon est prélevé selon la méthode de cinq points aliquotes récupérer sur une surface de 100 m² (fig. 5).



Fig. 5 : Le site des prélèvements de sol foresterie de la région d'Abd-El-Malek Ramdane (W. Mostaganem). A : Vue de loin de la forêt ; B : Point de prélèvement.

2.2. Isolement des actinomycètes

Une fois arrivés au laboratoire, les échantillons de sol sont distribués dans des boîtes de Pétri stériles. Le prétraitement des échantillons de sol est une étape préliminaire permettant de sélectionner les Actinomycètes dans les échantillons de sol. Les ensemencements sont effectués par la méthode de suspension-dilutions (fig. 6).

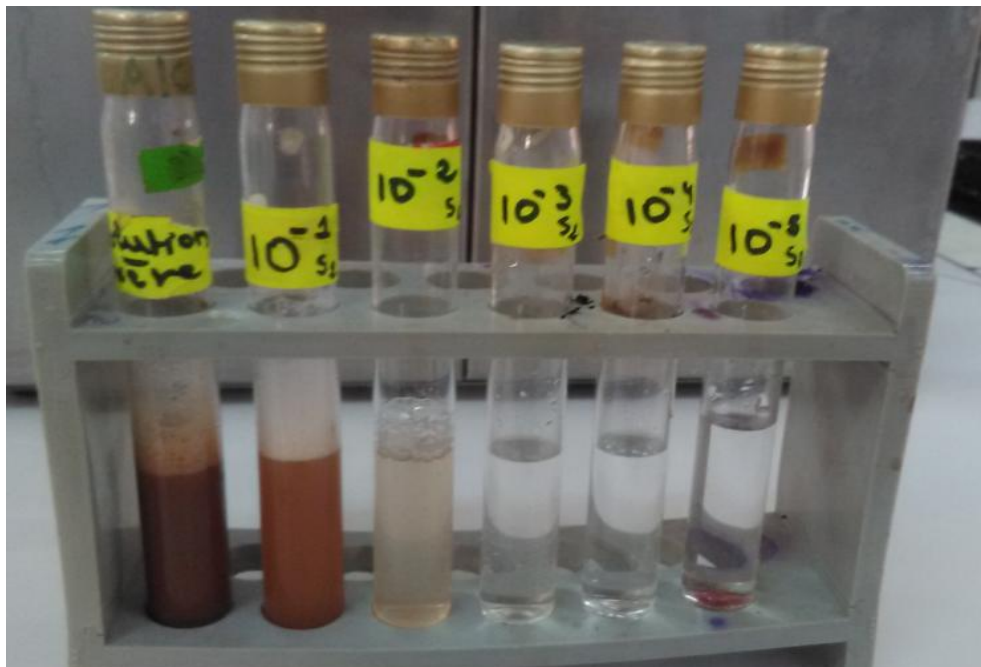


Fig.6 : Préparation des dilutions de sol

On met en suspension 1g du sol sec dans 9 ml d'eau physiologique stérile ([NaCl] 9 g.l⁻¹), cette dilution est considérée comme la solution mère (10⁻¹g/ml). Après homogénéisation au vortex, on réalise une série des dilutions décimales dans l'eau physiologique stérile jusqu'à 10⁻⁵ (**Kitouni, 2007**). Après la décantation des suspensions de sol, 100 µl de chaque dilution a été ensemencé et étalé par un râteau de pipette pasteur stérile sur un milieu de culture amidon caséine pH 7,0 (voir la composition de milieu (annexe I). Des antifongiques ou /et des antibactériens Gram ⁻ doivent être additionnée à raison de 10 µg/ml dans le milieu de culture. Leurs emplois dans le milieu d'isolement facilitent l'élimination totale des champignons, des levures et la plupart des bactéries à Gram négatif (**Ouhdouch et al. 2001**). Les boîtes de Pétri sont incubées à 30°C pendant 7 à 14 jours. Des observations régulières sont effectuées chaque jour (**Lemriss et al. 2003**).

2.3. Purification et conservation des isolats

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

2.4. Identification des actinobactéries

2.4.1. Caractérisations macroscopiques

Cette technique consiste examiné les colonies des différentes souches par la loupe binoculaire (ZEISS 475022 G x10) et à l'œil nu (**Williams et Cross, 1971**). Les caractéristiques macroscopiques sont basées sur la taille, la forme, la texture, l'observation des mycéliums (substrat et aérien) et les pigmentations diffusibles sur les milieux de culture (**wei et al 2014**).

2.4.2. Caractérisations microscopiques

La coloration de Gram est la base de l'identification d'une souche bactérienne. Car c'est le point de départ du choix des examens complémentaires à effectuer. Pour chaque colonie répondant aux caractéristiques macroscopiques des actinomycètes des frottis sont réalisés. Ces derniers sont colorés en premier lieu par une solution de violet de Gentiane qui est un colorant basique, pendant une minute. Ensuite les lames sont rincés par une solution iodo-iodurée (Lugol) qui agit en augmentant les interactions entre le colorant et les cellules. Afin que, celle-ci soient contrastées. Les frottis sont décolorés par l'alcool et rincées à l'eau distillée pour éliminer l'excès de la coloration.

Enfin, les frottis sont recoloré par un colorant basique de couleur rose la Fuschine, pendant une minute, puis rincés abondamment à l'eau du robinet. Une fois les lames sont séchées, elles sont examinées au microscope optique à l'objectif (Gx100) à l'aide d'une goutte d'huile

à immersion. Les résultats sont photographiés à l'aide d'un appareil photographique (personnel).

2.4.3. Les tests biochimiques

2.4.3.1. Hydrolyse de l'amidon

La souche estensemencée sur le milieu nutritif contenant 1 % (P/V) d'amidon soluble, après 14 jours d'incubation à 30°C, la culture est recouverte d'une solution de Lugol. L'hydrolyse de l'amidon est mise en évidence par l'absence de coloration autour des colonies.

Les zones contenant de l'amidon se colorent en bleu (**Geraldine et al. 1981**).

2.4.3.2. Hydrolyse de la caséine

L'hydrolyse de la caséine est étudiée sur un milieu gélosé contenant 5% de lait écrémé. Les boîtesensemencées sont observées après 14 jours d'incubation à 28°C. La clarification de la gélose autour des colonies témoigne l'hydrolyse de la caséine (**Geraldine et al. 1981 ; Chaphalkar et Dey, 1996**).

2.4.3.3. Hydrolyse de la gélatine

La souche est cultivée sur milieu nutritif contenant 0,4 % (P/V) de gélatine pendant 14 jours à 30°C. Les zones où la gélatine n'est pas dégradée s'opacifient lorsqu'une solution de chlorure mercurique est ajoutée. Les zones claires correspondent aux zones de l'hydrolyse (**Geraldine et al. 1981**).

2.4.3.4. Hydrolyse de lécithine et lipase

Les protéases hydrolysent les lipoprotéines et libèrent des lécithines solubles, des protéines et des lipides, cela se traduit par un éclaircissement autour de la culture. Ajouter à la gélose nutritive maintenue en surfusion à 45% d'émulsion de jaune d'œuf dans les conditions stériles. Les souches bactériennes sontensemencées par une strie à la surface du milieu puis incubé 1 à 5 jours à 37°C (**Joffin, 2013**). 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 lécitinase positif.
- Il n'y a pas de halo de précipitation signifie lécitinase négatif.
- Une zone de protéolyse est transparente, une zone d'opacification de lécitinase positif et lipoprotéinase positif.
- Une zone de protéolyse transparente signifie que le test de lécitinase négatif, et lipoprotéinase positif (**Joffin, 2013**).

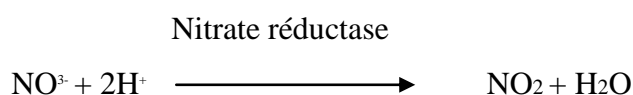
2.4.3.5. Utilisation de citrate comme une seule source de carbone

La pente du milieu de citrate de Simmons estensemencée selon une strie longitudinale au moyen d'une pipette Pasteur stérile avec un inoculum de la souche. L'incubation s'effectue à 30°C. L'observation de la croissance se fait quotidiennement durant une semaine (**Marchal et Bourdon, 1991**).

2.4.3.6. La réduction des nitrates

Des tubes contenant 10 ml du milieu bouillon nutritif supplémentés par 0,1 % (P/V) de nitrates de potassium sontensemencés, puis incubés à 30°C. Au 5^{ème}, 10^{ème} et 14^{ème} jour, trois gouttes des réactifs N(I) et N (II) sont ajoutées à 1 ml de la culture.

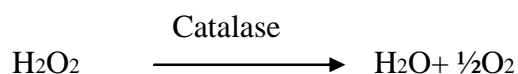
- La réduction des nitrates en nitrites est mise en évidence par l'apparition d'une coloration rouge.



- En l'absence de cette coloration, quelques milligrammes de poudre de zinc sont alors ajoutés : L'apparition de la coloration rouge indique que le test est négatif (les nitrates du milieu ne sont pas réduits par la souche).
- En l'absence de la coloration, le test est considéré comme positif (les nitrates sont réduits au delà du stade des nitrites) (**Marchal et al. 1991**).

2.4.3.7. Les recherche de catalase

Cette enzyme permet la dégradation du H₂O₂ qui résulte de l'oxydation par l'oxygène de l'aire:



Cette réaction est mise en évidence simplement par contact de la culture avec une solution fraîche de H₂O₂ (10%). Une goutte d'eau oxygénée est placée sur une lame en présence d'un échantillon de culture. Un dégagement gazeux abondant sous forme de mousse ou de bulle traduit la décomposition de dioxygène, le test de catalase est considéré comme positif. En cas d'absence de réaction le test est négatif (**Delarras, 2007**).

2.4.3.8. Les recherche de l'uréase

On ajoute une suspension en milieu d'urée-indole. La lecture effectuée après 5 à 7 jours d'incubation à 30 °C (Jouve, 2014)

- Si la couleur de milieu vire vers le rouge: Uréase positive.
- Si la couleur de milieu reste inchangée: Uréase négative.

2.4.3.9. Les test TSI

Ce test est réalisé en utilisant le milieu TSI (gélose au Glucose, Lactose Saccharose et H₂S). Des tubes contenant le milieu TSI sont ensemencés puis incubés pendant 7 à 14 jours à 30°C (Marchal *et al.* 1991). Les résultats se manifestent comme suit :

Lactose-saccharose positif : la pente du milieu de culture virant au jaune.

Glucose positif : culot jaune, la pente du milieu de culture rouge.

H₂S positif : noircissement du milieu dans la zone joignant la pente.

2.4.3.10. Les réactions VP et RM

Les colonies des souches isolées sont ensemencées sur un milieu liquide Clark et Lubs, puis incubé à 30°C pendant 7 jours. Après l'incubation, on divise le milieu dans deux tubes stériles et on ajoute quelques gouttes du réactif VP (I) dans l'un des deux tubes et le réactif 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 ,2013).

3. L'activité enzymatique

3.1. Préparation d'inoculum pour la fermentation

Les souches des actinobactéries déjà identifiées sont ensemencées sur un milieu amidon caséine agar. Après 7 à 10 jours d'incubation à 30° C, les spores sont raclées par ajout de 10 ml d'eau distillée stérile, suivie d'une agitation vigoureuse. Le comptage des spores a été estimé par mesure de l'absorbance à 540 nm, à l'aide d'un spectrophotomètre UV-visible (Jenway 6715). Des dilutions décimales sont effectuées en cas où l'inoculum est concentré, pour obtenir une suspension sporale de 10⁶ spore/ml. La pré-culture des spores des actinobactéries est utilisée pour inoculer les milieux de fermentation. Un volume 3 ml de l'inoculum (3% du volume utile) est transvasé dans un Erlenmeyer de 500 ml contenant 150 ml du milieu liquide spécifique pour l'extraction des amylases (Annexe I), incubés à 30 ° C pendant 7 jours sous agitation continue à une vitesse de 120 tours/min pendant 5 à 7 jours.

3.2. Extraction chimique des amylases

Après dix jours de fermentation une extraction brute des amylases a été réalisée selon le protocole de (Ajita sundarram et al, 2014). La technique consiste à récupérer les biomasses des différentes cultures par une filtration pour séparer le mycélium et récupérer le filtrat. Les différents filtrats ont été traités par la solution bicarbonate de sodium [0,05 M] (V/V). Ensuite, une centrifugation a été établie pour extraire la fraction enzymatique (4000 tr/min). Le surnageant est récupéré puis conservé dans des flacons à 4° C, pour tester l'activité enzymatique des amylases (Oomah et al. 2011).

3.3 Étude de la cinétique des extraits enzymatiques

3.3.1. Préparation de la gamme d'étalonnage d'ovalbumine par la méthode de Biuret

La réaction du biuret est une réaction mettant en évidence les liaisons peptidiques. La méthode consiste à mettre en milieu basique des ions cuivre (II), en présence de protéines. Il est également possible d'impliquer cette réaction dans un dosage colorimétrique à 540 nm. Un complexe coloré en violet se forme en effet lorsque les ions Cu(I) sont complexés par deux groupes carbonyles présents de part et d'autre d'une des liaisons peptidiques de la protéine. L'absorbance est relative à la concentration des extraits protéiques.

Mode opératoire

- Préparer de la solution mère d'ovalbumine à 0,5g/100 ml;
- Préparer des dilutions à partir de la solution mère ;
- Ajouter 4 ml du réactif Biuret dans les différentes dilutions ;
- Agiter et incuber pendant 15 minute à température ambiante ;
- Mesurer l'absorbance à une longueur d'onde 540 nm en utilisant un spectrophotomètre UV-visible ;
- Trace la courbe de la densité optique en fonction de la quantité d'ovalbumine.

3.3.2. 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'hydrolyse d'amidon par les extraits enzymatique. Cette réaction est basée sur l'intensité de la coloration du réactif Fehling en fonction de la quantité de sucres réducteurs.

Mode opératoire

- Préparer de la solution mère de glucose à 1g/100 ml ;
- Préparer des dilutions à partir de la solution mère à différentes concertations.
- Ajouter 1ml de tampon acétate de sodium à 0,5M dans chaque dilution ;

- Ajouter 5 ml du réactif Fehling aux différentes préparations ;
- Chauffer les tubes pendant 5 minutes dans un Bain-marie à 37°C ;
- Ajouter 3 ml d'eau distillée dans les tubes et laisser refroidir pendant 3 minutes environ ;
- Mesurer l'absorbance à une longueur d'onde $\lambda = 540$ nm ;
- Tracer la courbe de la densité optique en fonction de la quantité de glucose oxydé en μmol [DO = f (C)].

3.3.3. 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 à un pH constant (pH= 5,2) et à une température optimale de 40°C.

Mode opératoire

- Ajouter 3 ml de solution d'amidon dans des tubes a essai;
- Ajouter 1ml de la solution tampon acétate pH= 4,7 ;
- Ajouter 1 ml de l'extrait enzymatique dans les différentes préparations ;
- Agiter le mélange et incuber dans un bain marie à 30°C pendant 15 minutes en présence des tubes témoins;
- Après épuisement du temps ajouter 4 ml du réactif Fehling dans les différentes solutions ;
- Homogénéiser, boucher les tubes avec les vises et porter 5 minute au bain marie bouillant, après laisser refroidir ;
- Ajouter 4 ml d'eau distillée ;
- Agiter et laisser reposer 10 min à température ambiante, ensuite ;
- Les concertations des produits libérés après hydrolyse du substrat amidon en présence des différents extraits enzymatiques et quantifier par la mesure des DO à une $\lambda = 540$ nm contre le tube témoins en fonction du temps d'hydrolyse (Fig.23).

Remarque : La détection de sucre réducteurs a été estimée par la méthode de Fehling vu l'indisponibilité des réactifs plus spécifiques comme.

La détermination des paramètres cinétiques des extraits enzymatiques d'amylase dans un tampon acétate (pH = 4,7) est mise en évidence par la courbe de la gamme des dilutions du glucose en présence du réactif de Fehling (**AnnexeI**).

La variation de la concentration en substrat (amidon) dans le milieu réactionnel et dans des conditions optimales (pH et T°) permet de déterminer les paramètres cinétiques K_m , V_{max} et V_i de l'amylase. Nous avons utilisé la courbe d'étalonnage du glucose pour estimer la

quantité du produit (sure réducteur) libéré par l'hydrolyse de l'extrait enzymatique, selon l'équation suivante de **Michaelis-Menten** :

$$Vi = \frac{Vmax \cdot [S]}{Km + [S]}$$

Vi : Vitesse initiale d'oxydation (mol.l⁻¹.min⁻¹).

Vmax : Vitesse maximale d'oxydation (mol.l⁻¹.min⁻¹).

[S] : Concentration en substrat (Amidon) (mol.l⁻¹).

Km : Constante de Michaelis (mol.l⁻¹); elle correspond à la valeur de [S] pour laquelle

$$Vi = \frac{Vmax}{2}$$

Chapitre IV :
Résultats
et
discussions

IV. Résultats et discussions

1. Isolement des Actinomycètes

Quatre souches d'actinomycètes (S2, S5, S8, S9) sont identifiées et caractérisés selon leurs aspects macro et microscopiques. Ces observations à la loupe binoculaire et au microscope optique confirment que les souches font partie du genre *Streptomycètes* sp.

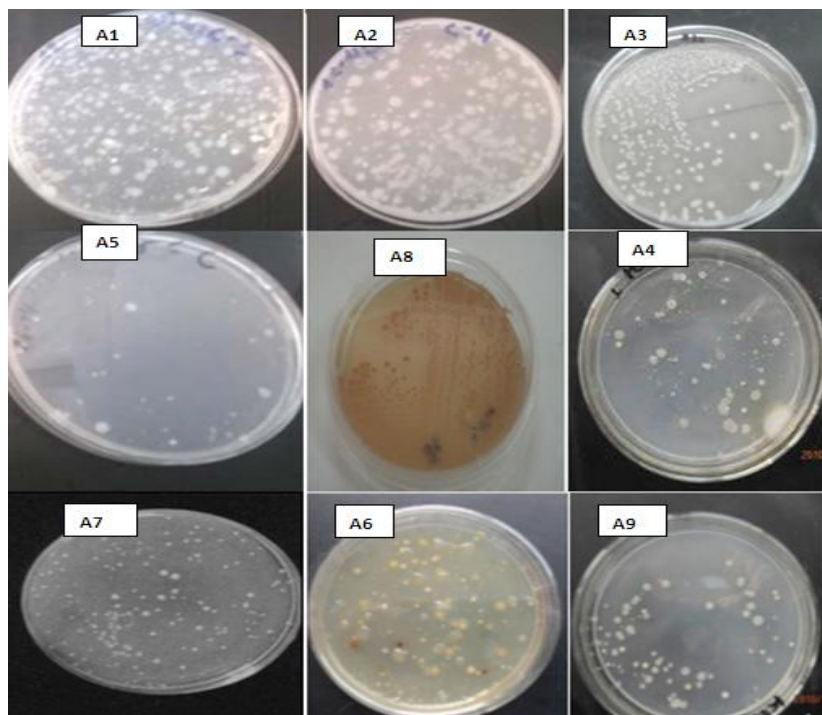


Fig.7 : les photos du premier isolement des actinomycètes.

2. Identification morphologique des souches d'actinomycètes

2.1. Identification macroscopique

Après la sélection et la purification, les colonies d'actinomycètes sont reconnues sur la base de leurs aspects morphologiques qui expriment un polymorphisme génétique des isolats (S2, S5, S8 et S9). Des variations morphologiques visibles à l'œil nu sont observées telles que, les tailles de colonies qui varient entre 1 à 3 mm, couleur etc. Ces différents critères morphologiques sont décrits dans le tableau ci-dessous et illustré à travers la fig. 7.

Tableau 3 : Caractérisations macroscopiques des isolats d'actinobactéries.

souches	S2	S5	S8	S9
caractères				
Couleurs	Blanchâtre	Jaune	blanche	blanche
Aspects	Rigoureuses	Rigoureuses	Lisse, poudreuse	Lisse, poudreuse
Formes	Bombée	Aplaties	bombée	bombée
Diamètre	0.5 à 1.2µm			

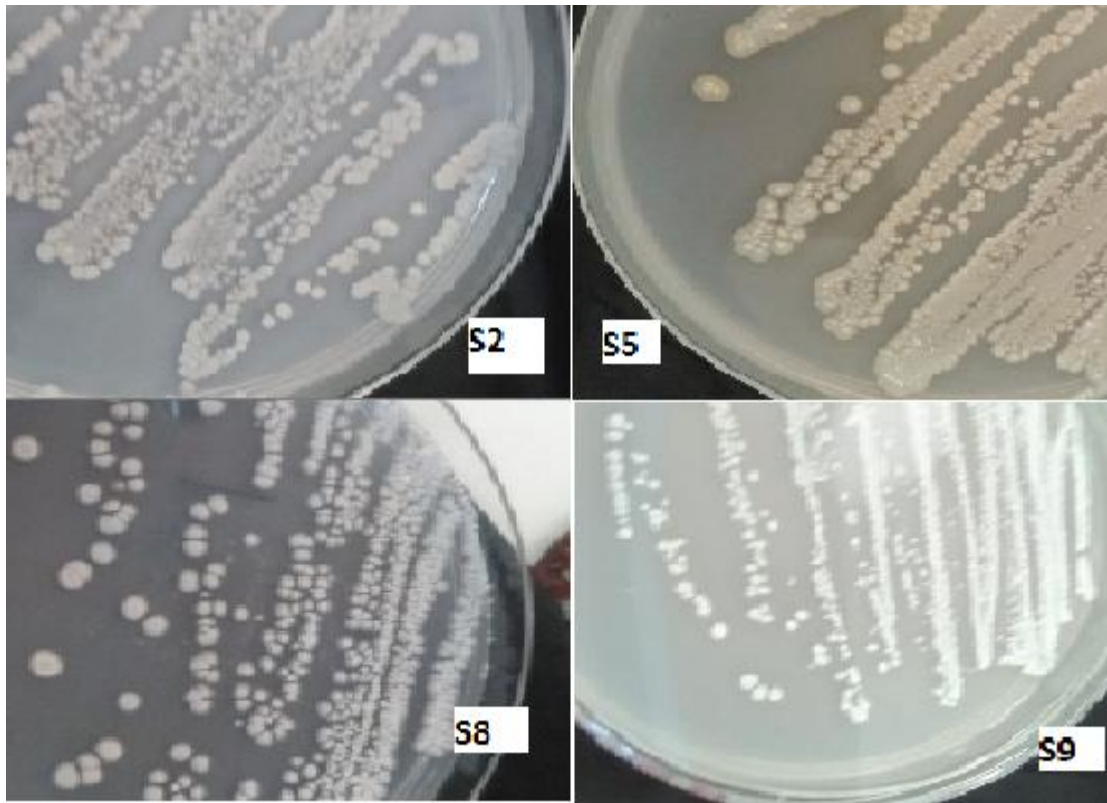


Fig. 8 : Aspect macroscopiques des colonies pures d'actinobactéries.

Toutes les colonies ont été purifiées par repiquage sur un milieu amidon caséine agar et incubées à 30 °C pendant 7 jours. Les colonies d'actinomycètes ont été reconnues par leurs aspects morphologiques caractéristiques. Elles apparaissent sèches, rugueuses, colorées ou non, adhérent à la gélose et présentent un mycélium végétatif et aérien (tab.3 et fig. 8). Certaines montrent seulement un mycélium du substrat. Ces critères morphologiques obtenus sont tout à fait comparable avec ceux qui ont été déjà décrit par **Prescot et al (2011)**.

2.2. Etude microscopique

Les observations microscopiques de coloration de Gram des quatre souches isolées sont photographiées au grossissement 100x (fig.9). La coloration de Gram des actinomycètes montre que les bactéries sont filamenteuses à Gram-positif. Ces filaments sont septés, ramifiées, prenant la coloration violette du réactif violet de gentiane. Ces champignons à rayon ou champignons rayonnants n'ont pas de membrane nucléaire (fig.9), elles possèdent hyphes rassemblant à des tubes distingués des bactéries. Leurs diamètres sont plus petits (0,5 à 1,2µm) que celui des champignons.

En effet, d'après **Larpen et al. (1989)**, il existe donc une transition entre les formes mycéliennes typiques et les formes unicellulaires, présentant une aptitude peu marquée à former un mycélium ramifié présente des similitudes avec les Eubactéries et avec les champignons (fig. 9).

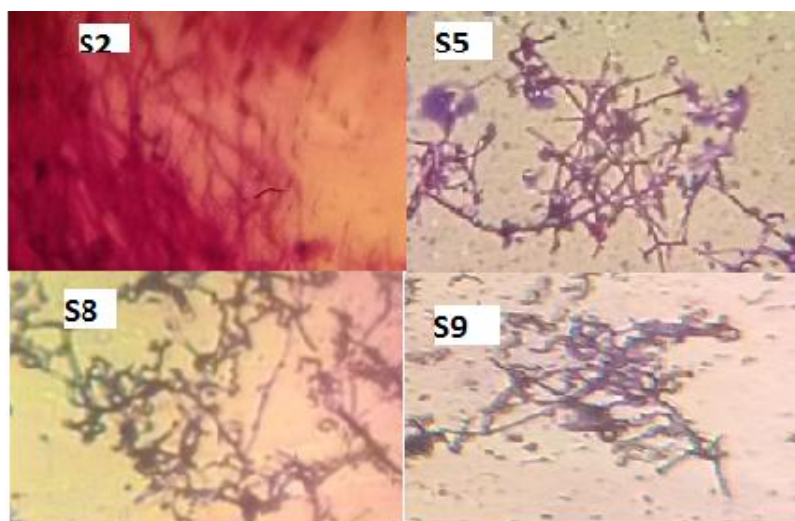


Fig.9 : Observation microscopique des souches actinomycètes (G× 100), après la coloration de Gram.

3. Tests physiologiques et biochimiques

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

Tableau 4 : Les Tests physiologiques et biochimiques des isolats d'actinomycètes.

Caractéristiques		TM	S2	S5	S8	S9
Les souches						
Hydrolyse de l'amidon		-	+	+	+	+
Hydrolyse de caséine		-	+	+	+	+
Hydrolyse de la gélatine		-	+	+	+	+
Hydrolyse de la lécithine		-	+	+	+	+
Réduction des nitrates		-	+	+	+	+
Recherche de Catalase		-	+	+	-	+
Dégradation de l'urée		-	+	-	+	+
Test TSI Fermentation	du glucose	-	-	-		+
	du lactose	-	+	+	+	-
	du saccharose	-	+	+	+	-
	Production d'H ₂ S	-	-	-	-	-
L'utilisation de citrate		-	-	-	+	+
Les fermentations intermédiaires	VP	-	+	+	+	+
	RM	-	+	+	+	+
TM : Témoin ; S : Souche ; (+) : Test positif ; (-) : Test négatif ; VP : Vogues Prauskouer ; RM : Rouge méthyle						

3.1. Hydrolyse de l'amidon

L'absence de coloration autour des bactéries, signifie l'hydrolyse de l'amidon dans cette zone. Cette dégradation est due à la sécrétion des enzymes amylasiques dans le milieu par les bactéries. Par contre la couleur marron du réactif Lugol dans le reste du milieu a virée vers la couleur bleue, dans les zones dépourvues des cultures bactériennes, ce qui explique l'absence des enzymes dans ces zones et la conservation du milieu de l'amidon. Le test d'hydrolyse de l'amidon est positif pour les quatre isolats d'actinomycètes (tab. 4 et fig. 10).

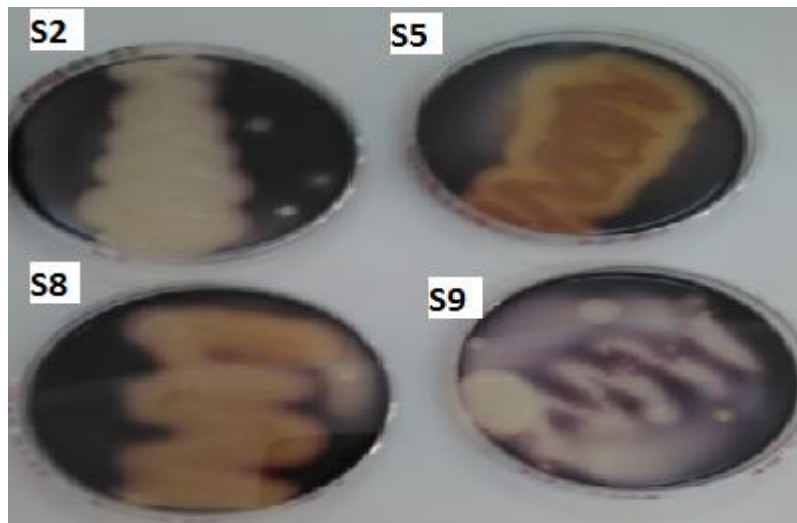


Fig.10 : Test positif d'hydrolyse de l'amidon pour des 4 isolats des *Streptomyces sp.*

3.2. Hydrolyse de caséine

La présence de ces zones claires signifie que la caséine présente dans le milieu de culture a été hydrolysée par les souches. Cela qui approuve que ces bactéries ont la capacité de synthétisées l'enzyme chimosine et trypsine. Donc le test d'hydrolyse de la caséine est positif pour les quatre isolats d'actinomycètes (tab. 4 et fig.11).

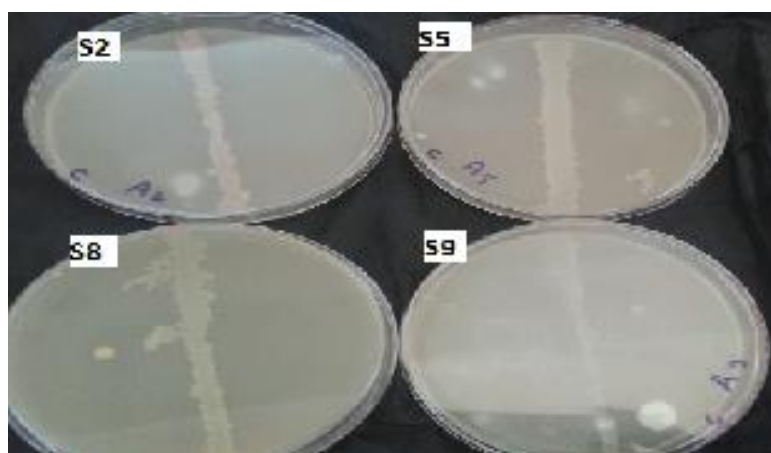


Fig.11 : Tests positifs d'hydrolyse de la caséine pour des 4 isolats des *Streptomyces sp.*

3.3. Hydrolyse de la gélatine

La présence de zones claires autour des cultures des tous les isolats signifie que la gélatine présente dans le milieu de culture a été hydrolysée par les souches. Ces bactéries ont la capacité de synthétisées et de secrétés l'enzyme gélatinase. Le test d'hydrolyse de la gélatine est positif pour les quatre isolats d'actinomycètes (tab. 4 et fig. 12).

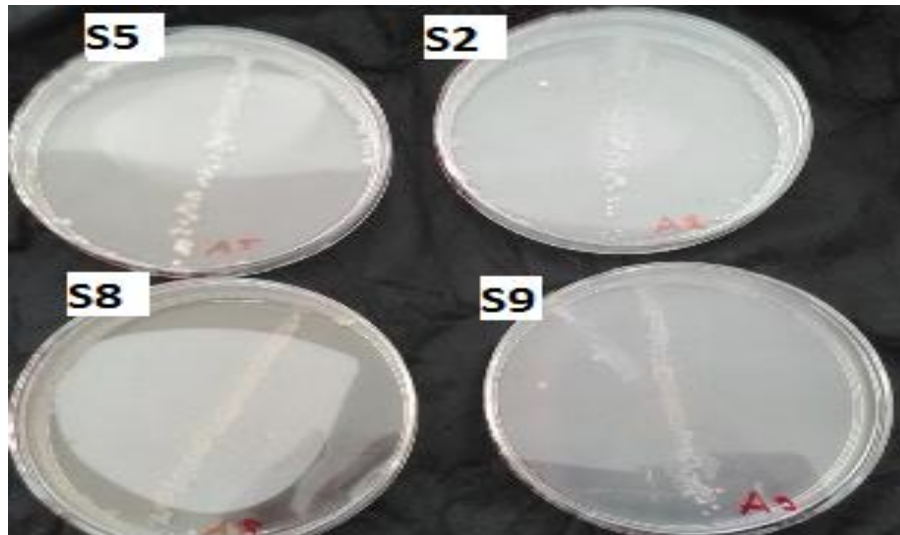


Fig.12 : Test positif d'hydrolyse de la gélatine pour les 4 isolats des *Streptomyces sp.*

3.4. Hydrolyse de la lécithine

Des zones claires sont apparus autours des souches se qui permet de dire que la lécithine présente dans le milieu de culture a été hydrolysée par les souches. Cela peut être expliqué par une synthétise extracellulaire de l'enzyme lécithinase par les souches d'actinomycètes. Cependant, les résultats du test d'hydrolyse de la lécithine sont positifs pour les quatre isolats d'actinomycètes (tab. 4 et fig. 13)

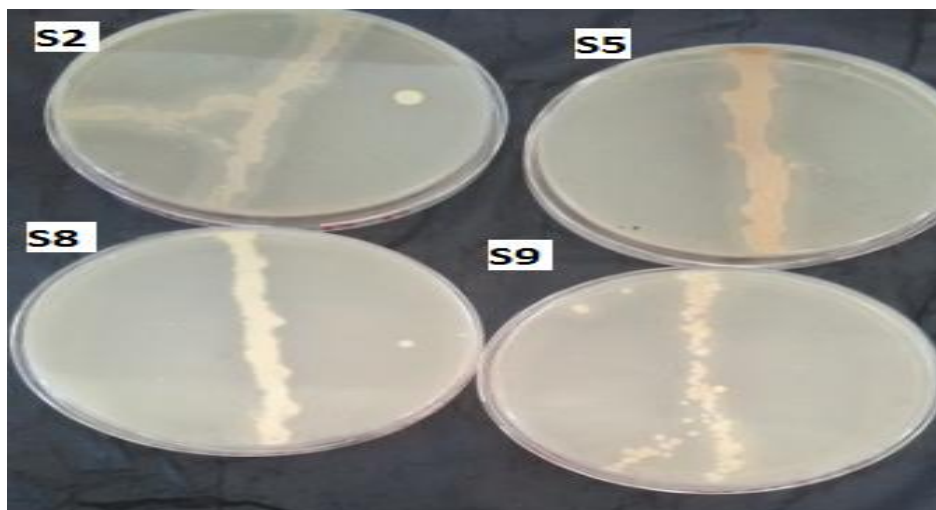


Fig.13 : Test positif d'hydrolyse de la lécithine pou les 4 isolats des *Streptomyces sp.*

3.5. Réduction des nitrates

La figure 14 ci-dessous montre que le test des nitrates est positif en présence des quatre souches de *Streptomyces* sp. La couleur du milieu change en présence des réactifs NR1 et NR2. Cela permet de dire que les nitrates du milieu sont transformés en nitrites, ce qui explique que les bactéries possèdent l'enzyme nitrate réductase très active.



Fig.14 : Test positif de la réduction des nitrites pour les 4 isolats des *Streptomyces* sp

3.6. Recherche de Catalase

Le test de la recherche de catalase est positif pour l'ensemble des isolats de *Streptomyces* sp (S2, S5 et S9) à l'exception de l'isolat S8 (fg. 15)

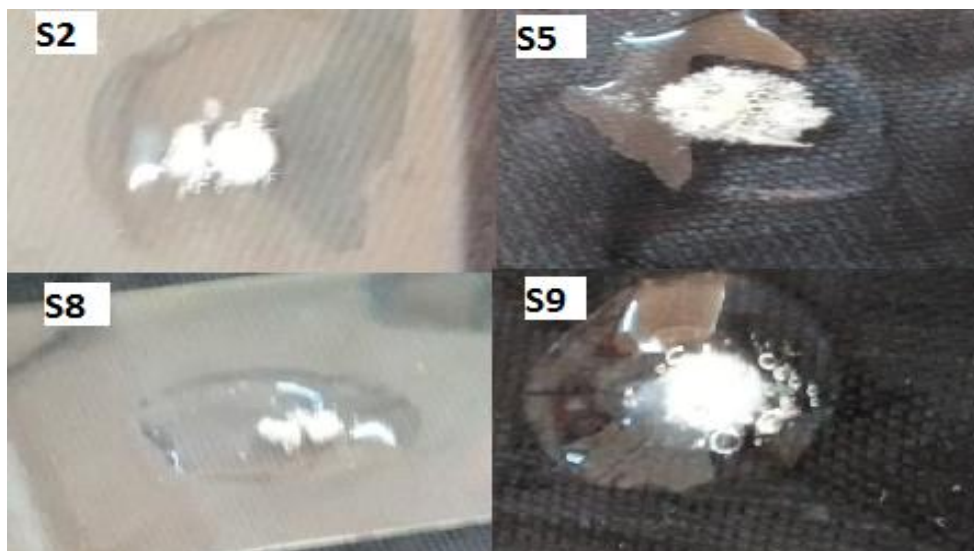


Fig.15 : Test de la catalase positif tous les *Streptomyces* sp, sauf, avec l'isolat 8.

3.7. Dégradation de l'urée

L'obtention de la couleur rouge du milieu avec les souches S2, S8 et S9 indique la dégradation de l'urée à l'exception de l'isolat S5. Cela signifie que les trois isolats (S2, S8 et S9) présentent un test positif, ce qui traduit que les souches bactériennes possèdent l'enzyme uréase responsable à la dégradation de l'urée (fig. 16).

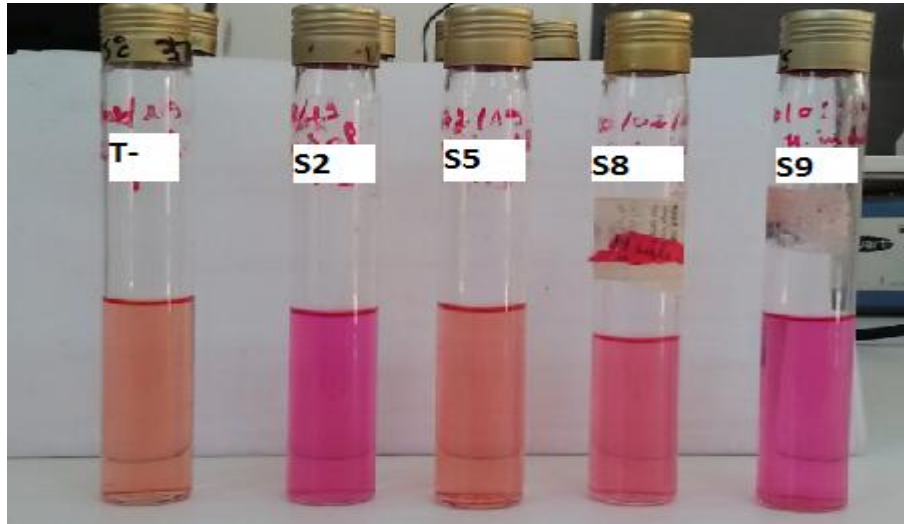


Fig.16 : Test positif de la dégradation de l'urée pour isolats S2, S8 et S9 de *Streptomyces sp.*

3.8. Test TSI

Les quatre isolats de *Streptomyces sp* présentent un test négatif d'où on n'a pas noté un noircissement du milieu dans la zone joignant la pente des tubes de TSI. Cela explique que les souches bactériennes ne sont pas productrices de H_2S . Les isolats S2, S5 et S8 fermentent les sucres lactose et saccharose présentent une pente virant au jaune. Par contre, l'isolat S9 qui fermente le glucose la pente est rouge (Fig. 17).

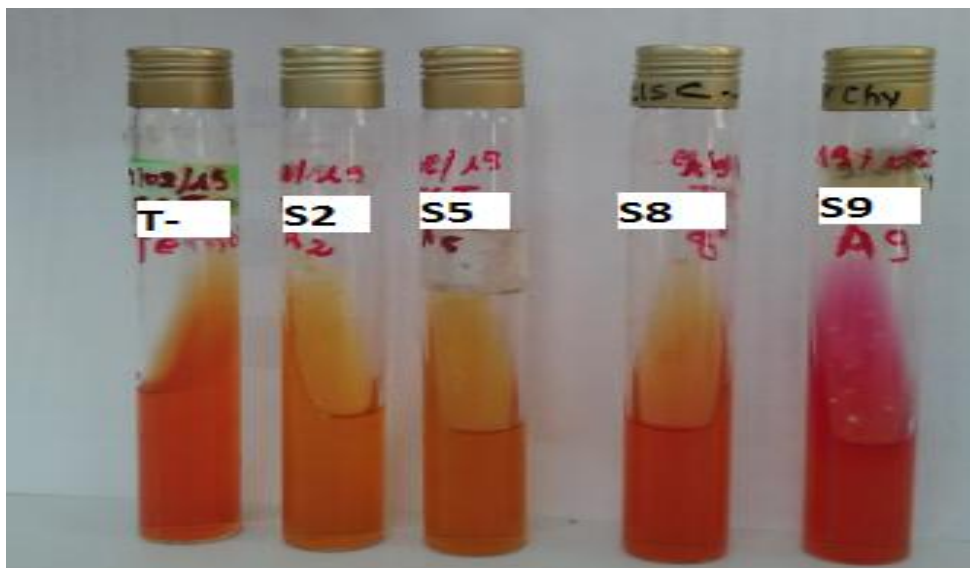


Fig.17 : Test négatif de la production d' H_2S avec les quatre isolats de *Streptomyces sp.*

Les tests sont positifs pour la fermentation des sucres lactose et saccharose avec les isolats S2, S5 et S8, en outre le test de glucose est positif avec un seul isolat qui est le S9.

3.9. L'utilisation de citrate

Les résultats obtenus avec les quatre isolats de *Streptomyces* sp sont positifs avec S8 et S9, ces souches ont utilisés le citrate du milieu comme source de carbone. La couleur du milieu a virée vers la couleur bleue. Avec les souches S2 et S5 les tests sont négatifs, les deux isolats n'ont pas épuisé la source de carbone du milieu citrate. La couleur du milieu est restée vert et elle n'a pas virée vers le bleu (fig. 18).

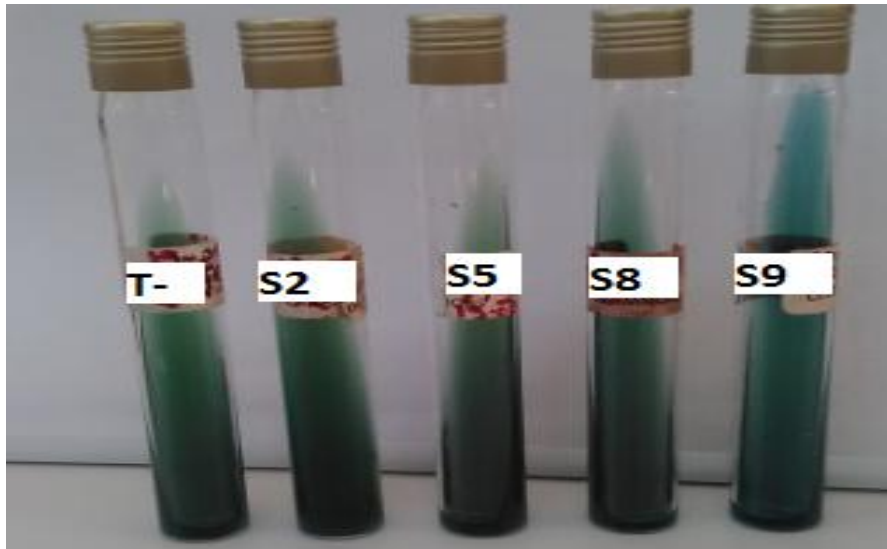


Fig.18 : Test positif de l'utilisation de citrate avec isolats S8, S9 des *Streptomyces* sp.

3.10. Les réactions de VP et RM

Les tests de VP et RM sont positifs, la couleur à virer vers le rouge. Les souches d'actinomycètes (S1, S2, S3, S4, S5 et S6) assurent les réactions de VP et RM des acides mixtes en présence des réactifs RM et butylène glycolique avec VP (fig. 19).

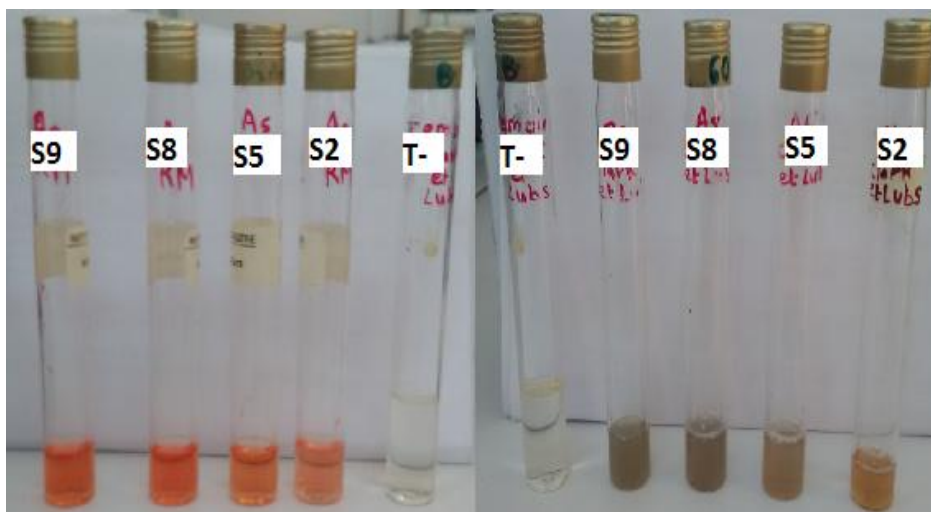


Fig.19 : Tests de VP et RM positifs pour les quatre isolats de *Streptomyces* sp.

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

4.1. Dosage des extraits enzymatiques par la réaction de Biuret

Le dosage colorimétrique des extraits enzymatiques par la méthode de Biuret est exprimé par la concentration des extraits protéiques des enzymes solubles de *Streptomyces* sp. La quantification est réalisée grâce au dosage des dilutions de la protéine ovale albumine dans les mêmes conditions opératoires (pH= 5 et T= 37°C) et l'utilisation de la courbe d'étalonnage d'ovalbumine (Fig. 20).

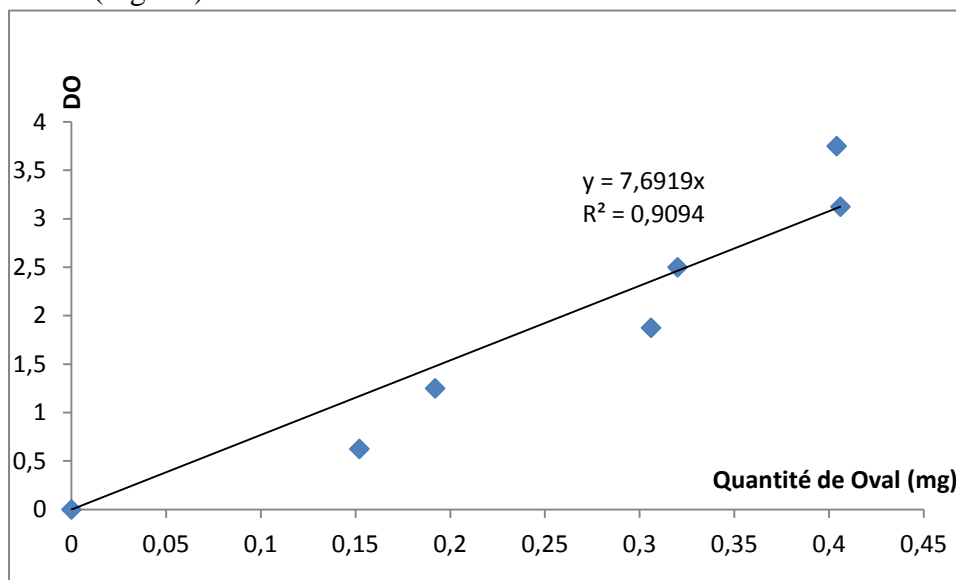


Fig.20 : Courbe de la gamme d'étalonnage de la protéine ovalalbumine.

Les figures 20 et 21 représentent respectivement la gamme d'étalonnage d'ovale albumine et les concentrations des extraits enzymatiques des quatre isolats de *Streptomyces* sp.

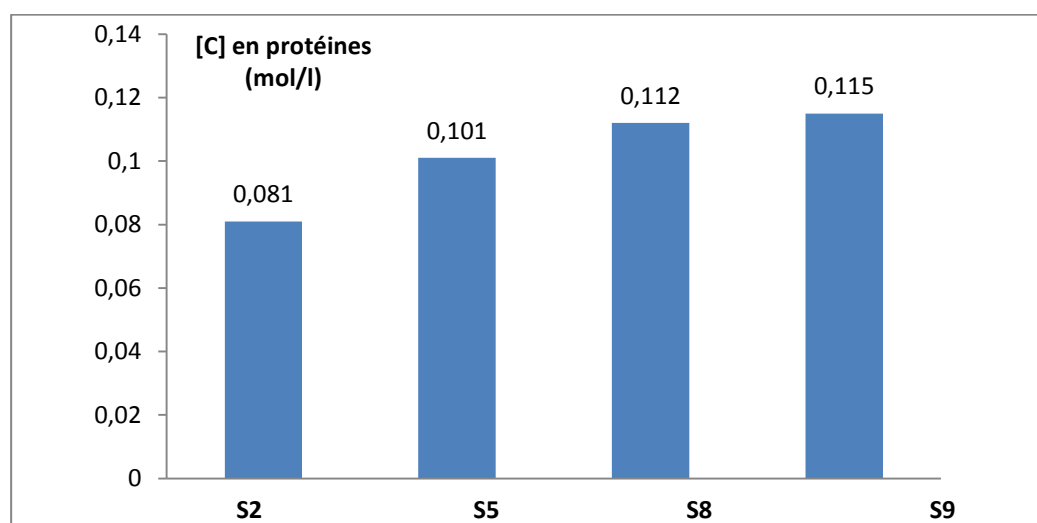


Fig. 21 : Concentrations des extraits protéiques des quatre isolats *Streptomyces* sp.

Les résultats obtenus sur les concentrations des extraits protéiques confirment les résultats des tests d'hydrolyses d'amidon. Les deux isolats de *Streptomyces* sp S8 et S9 renferment une concentration protéique supérieure (0,112 ; 0,115 mol /l) par ordre par rapport aux les isolats S2 et S5 (fig. 21).

4.2. Mesure des paramètres cinétiques des extraits d'amylasiques des isolats *Streptomycètes* sp

Les extraits enzymatiques des amylases bruts obtenus à partir des isolats de *Streptomycètes* sp sont dilués et utilisés pour l'étude de la cinétique d'hydrolyse de glucose. Cette dernière 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 et le sucre réducteur libéré (glucose) après hydrolyse du substrat l'amidon par les extraits enzymatiques (fig. 22 et fig. 24).

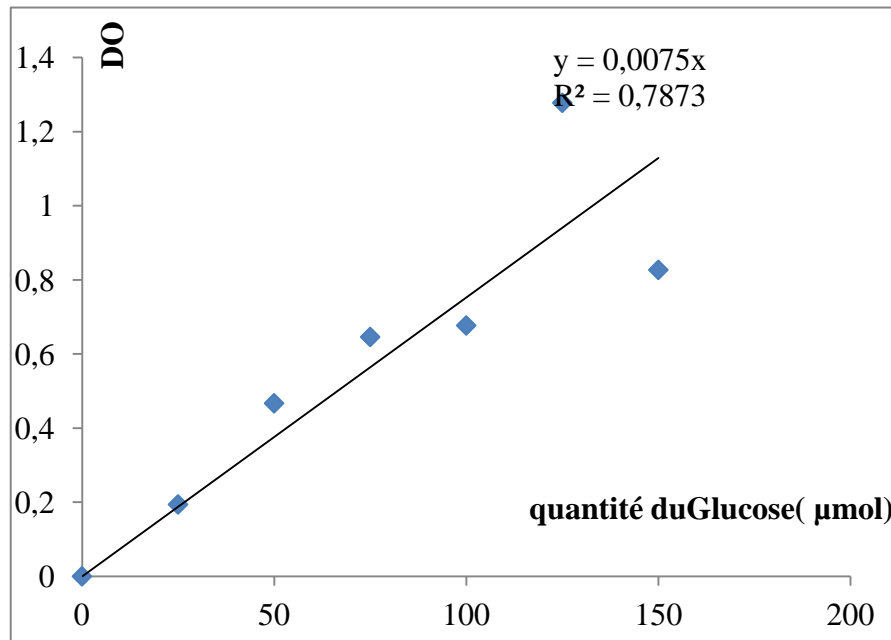


Fig.22 : Courbe de la gamme d'étalonnage du sucre réducteur pur le glucose.

La courbe de la gamme d'étalonnage du sucre réducteur glucose pur obtenue présente un coefficient de régression de $R^2 = 0,787$ qui se rapproche de la valeur 1. Cela signifie que les différentes dilutions sont en linéarité. Cette courbe permet à estimer les quantités du produit libérer après l'hydrolyse du substrat (amidon).

4.3. Mesure des paramètres cinétiques

Les courbes des cinétiques (fig.24 et 25) permettent de calculer les constantes cinétiques K_m et V_{max} de l'amylase, afin, de caractériser les activités enzymatiques (tab.5).

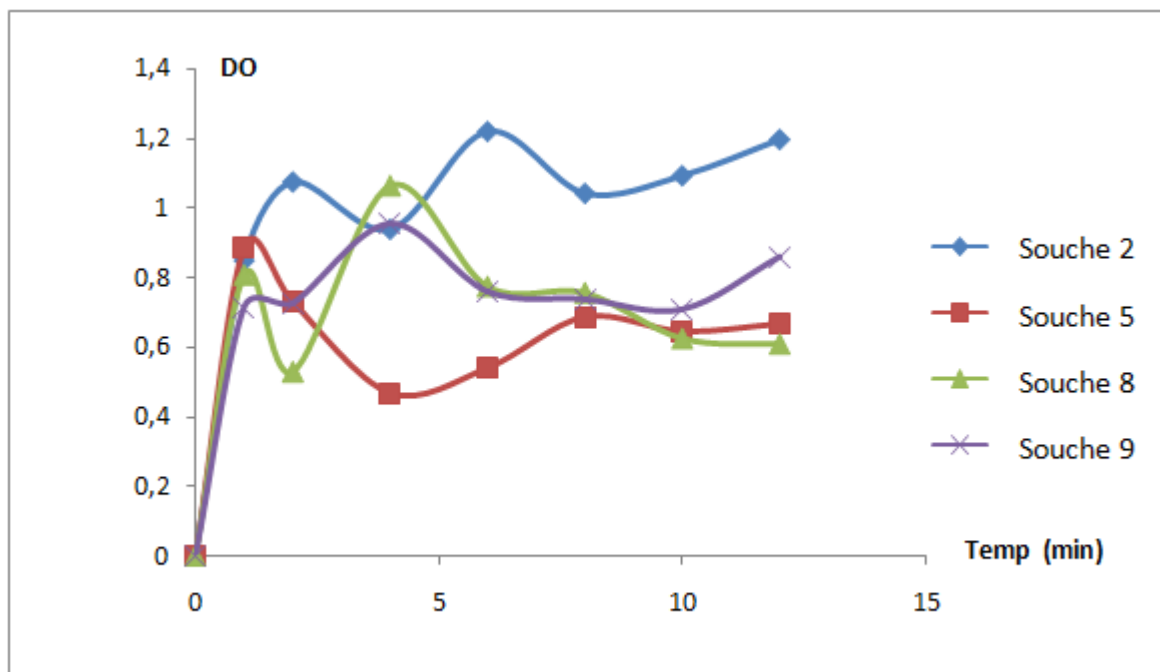


Fig. 23 : les courbes des densités optiques du glucose libéré après hydrolyse d'amidon par les extraits enzymatiques de *Streptomyces* spp.

Le suivi de la cinétique des différents extraits par les mesures des densités optiques montrent clairement que l'action de l'extrait enzymatique la souche (S2) à une transformation rapide et supérieure vis-à-vis le substrat amidon comparant avec les autres extraits (fig. 23).

Les extraits enzymatiques hydrolysent le substrat d'amidon progressivement en fonction du temps. On remarque que les extraits des souches S2 et S8 présentent des densités optiques élevées (1,198 ; 1,061) en ordre par rapport les extraits de les souches S5 et S9 (0,887 ; 0,954).

Grâce à ces courbes cinétiques, on utilise la courbe de la gamme d'étalonnage du glucose (fig. 22) pour calculer les quantités des produits libérés (glucose) après hydrolyse du substrat (fig. 24).

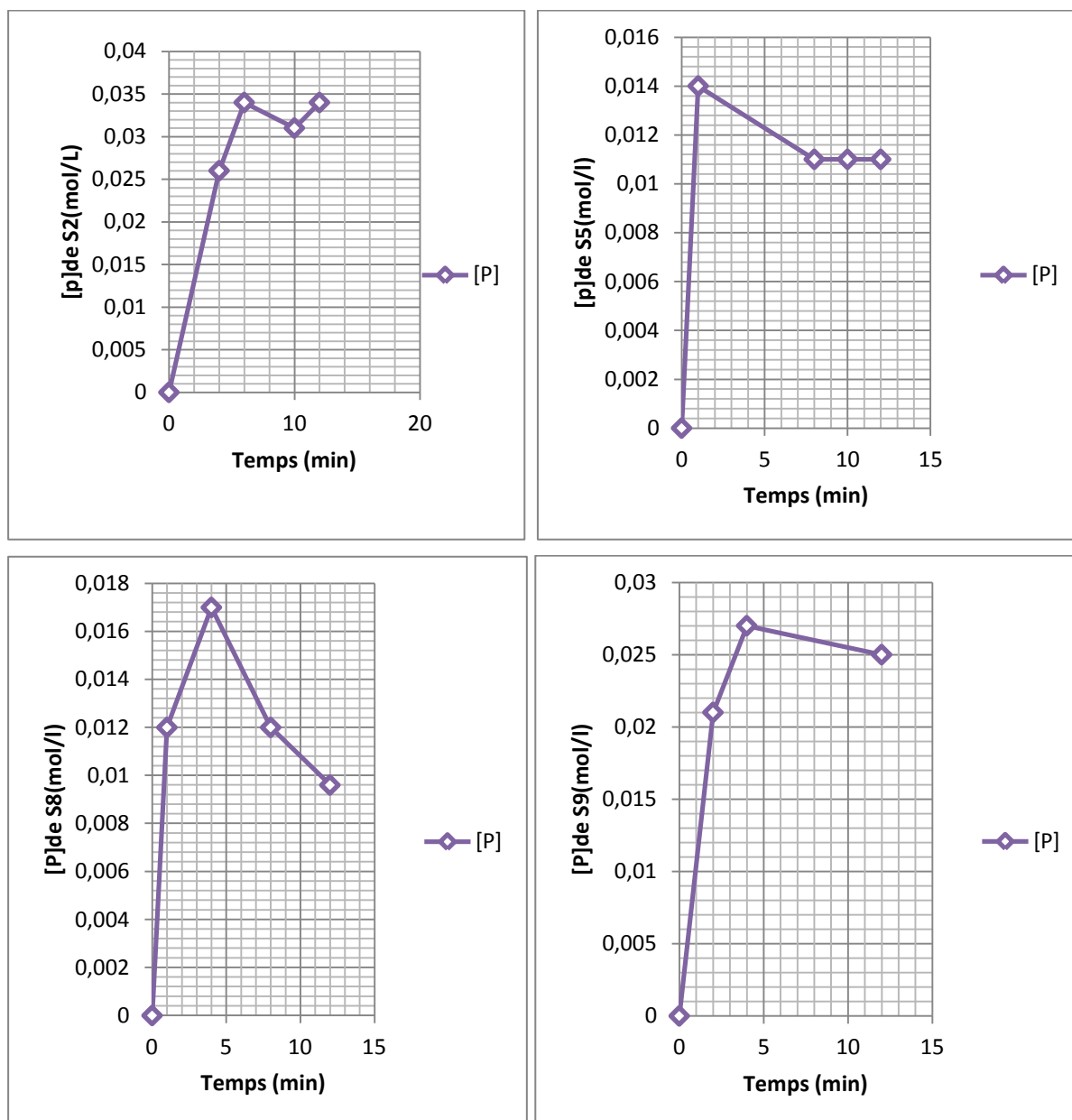


Fig. 24: Cinétiques des extraits d'amylases des différentes souches *Streptomyces* sp (S2, S5, S8 et S9).

Les *Streptomyces* sont la source la plus commune d'amylase. **Ragunatha et Padhmadras, (2013)**. Cette méthode utilisée confirme que les extraits enzymatiques des isolats de *Streptomyces* sp sont riches de cette enzyme. La quantification de ce dernier permet de déterminer les vitesses des réactions (V_i) pour tracer les courbes $V_i = f([P])$ et calculer les paramètres cinétiques K_m et V_{max} (fig. 25, tab 5).

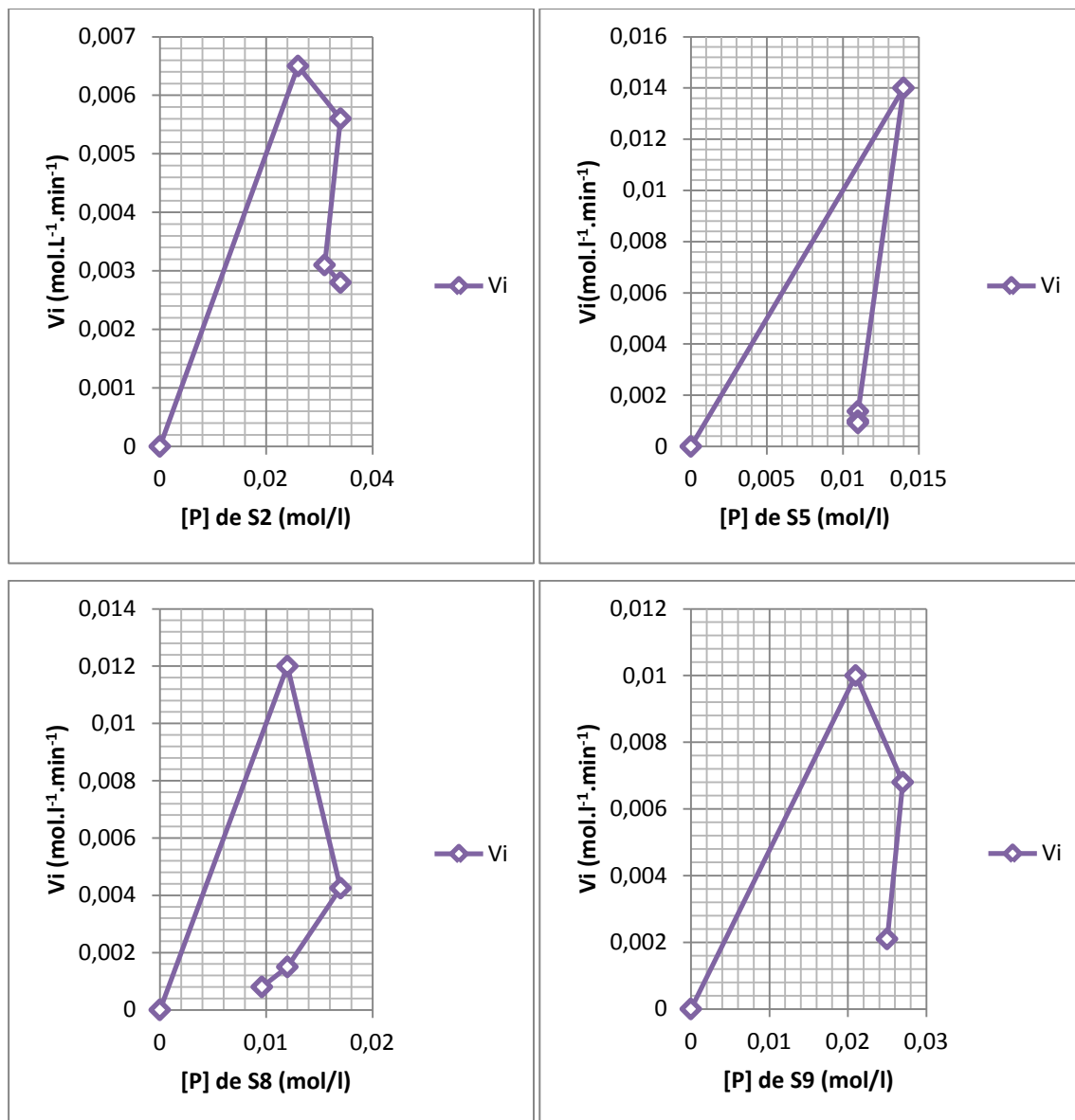


Fig. 25: Cinétiques des extraits d'amylases des différentes souches *Streptomycètes sp* (S2, S5, S8 et S9).

Tableau 5: Paramètres cinétiques des extraits d'enzymes des isolats de *Streptomyces sp.*

Souches	S2	S5	S8	S9
Paramètres				
Vmax [$\text{mol l}^{-1}\text{min}^{-1}$]	$6,5 \times 10^{-3}$	14×10^{-3}	12×10^{-3}	10×10^{-3}
Km	$12,5 \times 10^{-3}$	7×10^{-3}	6×10^{-3}	$10,5 \times 10^{-3}$
V_i [$\text{mol l}^{-1}\text{min}^{-1}$]	$5,2 \times 10^{-3}$	12×10^{-3}	11×10^{-3}	$8,2 \times 10^{-3}$

On note les valeurs du Km les plus faibles pour les souches de *Streptomyces* spp. S2 ; S5 et S9 ($12,5 \times 10^{-3}$; 7×10^{-3} ; $10,5 \times 10^{-3}$) par ordre avec des vitesses supérieures ($5,2 \times 10^{-3}$; 12×10^{-3} ; $8,2 \times 10^{-3} \text{ mol.l}^{-1}.\text{min}^{-1}$) par rapport à la souche S8 de km (6×10^{-3}) avec une vitesse ($11 \times 10^{-3} \text{ mol.l}^{-1}.\text{min}^{-1}$) (tab.5). Le Km traduit l'affinité de l'enzyme avec le substrat (amidon), le Km le plus faible reflète une grande affinité avec le substrat. La souche de *Streptomyces* sp.S2 ; S5 et S9 présentent une bonne affinité contrairement à la souche S8.

Les travaux de **Ragunathan et Padhumadas, (2013)**, réalisés sur les activités des amylases de *Streptomyces* sp confirment les résultats obtenus.

D'après Loqman, (2009), les *Streptomyces* sp constituent l'un des groupes des bactériens les plus variables et les plus importants de point de vue écologique et biotechnologique. En effet, ces microorganismes ont une grande capacité à produire de nombreux métabolites secondaires ayant des structures chimiques et des activités biologiques très diverses tels que les antibiotiques, les antifongiques, les enzymes, des stimulateurs et/ou des inhibiteurs de la croissance etc.

Conclusion
et
Perspectives

Conclusion et perspective

Les résultats obtenus après la sélection et la purification des isolats d'actinomycètes, ainsi que, les observations morphologiques, suivie des tests physiologiques et biochimiques des différents isolats d'actinomycètes présentent les caractéristiques du genre *Streptomyces* sp.

Les colonies obtenues sont de tailles différentes petite, moyenne et grande, dont leurs diamètres varient de 1 à 3 mm. Plusieurs formes de colonies sont obtenus (lisse, bombé, aplatie), avec un mycélium végétatif (mycélium aérien) de couleurs variables (jaune, marron, et blanche etc.). L'examen microscopique révèle que les bactéries sont de Gram positif.

Les tests physiologiques d'hydrolyses (caséine, amidon), ainsi que, les tests biochimiques (hydrolyse de gélatine, catalase, réduction des nitrates) sont positif pour tous les isolats, à l'exception de la production de gaz d'H₂S est négatif. Les résultats de la cinétique enzymatique des extraits amyliques montrent une variation dans les activités amyliques. Les souches de *Streptomyces* sp. S2 et S3 présentent une bonne affinité avec le substrat amidon, les valeurs du Km sont très faibles de $12,5 \times 10^{-3}$ et $10,5 \times 10^{-3}$ respectivement. Les vitesses initiales des réactions varient selon les extraits enzymatiques (Vi) (S2 = $5,2 \times 10^{-3}$; S5 = 12, 1; S8 = 11×10^{-3} ; S9 = $8,2 \times 10^{-3}$ mol l⁻¹min⁻¹).

En perspectives, il est recommandé dans la venir de :

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

Références
bibliographiques

Références bibliographiques

1. **Ajita Sundarram, Thirupathihalli Pandurangappa Krishna Murthy; (2014).** α -Amylase Production and Applications: A Review. Journal of Applied & Environmental Microbiology.; 2(4):166-175. doi: 10.12691/jaem-2-4-10 .
2. **Alexander M; (1991).** Introduction to soil microbiology, (edn) Willy .NewYork.
3. **Aouar, L ; (2006).** Mise en évidence des actinomycètes aérobies pathogènes impliqués dans les infections traitées au service des maladies infectieuses du CHU de Constantine. Étude des caractéristiques culturelles des souches isolées et purifiées. Mémoire de magister : Microbiologie appliqué constantine, Algérie.
4. **Arpin p , kilbertus G , francois ponge J ,vannier G ;(1980).** Importance de la microflore et de la microfaune en milieu forestier. France, **hal-00507109**
5. **Atlas R. M. and Bartha R., (1992).** Microbial ecology. Fundamentalsn and applications. 3rd edition. The Benjamin/Cummings Publishing Company. San Francisco, California (USA), p563, Mémoire : Biodégradation du 2,4-dichlorophénol par le microbiote tellurique de la région de Hamla (Batna).
6. **Boullard B., et Moreau J ; (1962).** Sol, microflore et végétation. Edition ; Masson; paris, 289p.
7. **Calvet R ; (2003).** Le sol propriétés et fonctions, T1.ED France agricole, Paris. 456 pages.
8. **Chaphalkar S.R. et Dey S ;(1996)** Computer assisted identification of *Streptomyces* species with high extracellular protease activity. Actinomycete. 7(2): 47-54.
9. **Davet. P ; (1996).**Vie microbienne du sol et production végétale. Edition INDRA. Paris p 63-81.
10. **Delarras. C ; (2007).** Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyses ou de contrôle sanitaire: Aliments, produits cosmétiques, eaux, produits pharmaceutiques. Éditions Médicales Internationales, Lavoisier 476 p.
11. **Dellal A et Halitim A., 1992.** Activités microbiologiques en conditions salines.cas de quelques sols salés de la région de relizane (Algérie) Cah. Agri.vol 1, N°5, éd John Libbey Euro texte, paris.
12. **Desouza. PM, Deoliveirae. P et Magalhães;(2010).** Application of microbial - amylase in industry – a review. Brazilian Journal of Microbiology 41: 850-861 ISSN 1517-8382.

13. Dommergues, Y. Mangenot, F ; (1970). ecologie microbienne du sol .Masson et Cie, paris, pp9-72(796).
14. Ensign .J.C; Normand .P; Burdden J.P. et Yallop C.A; (1993). Physiology of some actinomycetes genera. Res. Microbiol.144, 657-660.
15. Fickers .P ; Destain J et Thonart. P., (2008). Les lipases sont des hydrolases atypiques : principales caractéristiques et applications. Biotechnologie, Agronomie, Société Environnement, 12(2) : 119-130.
16. Geraldine, M; Schofield. M; Schaal, K. P,(1981). A numerical taxonomic study of members of the Actinomycetaceae and related taxa. J Gen Microbiol, 127(2): 237–259.
17. Girard M.C ; Walter C ; Remy J.C ; Berthelin J ; et Morel J.L ;(2005). Sols et environnement. Dunod, Paris.france.
18. Gobat .M ; Argano. M ; Mathey W ; (2003). Le sol vivant, France, 568pages.
19. Goodfellow. M et Williams S.T, (1983). Ecology of actinomycete. Ann. Rev. Microbiol. 37,189-216.
20. Jakimowicz .D; (2007). Chromosome segregation and cell division during the growth and differentiation of *Streptomyces*. PostepyHig. Med. Dosw. 61: 565-575.
21. Jerome. P; Lory .S; StaleyJ .S; (2004). Microbiologie, Ed Paris., 891pages
22. Joffin .N, (2013). Les techniques de laboratoires utilisées en mycologie,p. 1-20
23. Jouve, (2014). actinomycetes genera. Res. Microbiol.144,657-660. Achevé d'imprimer en France N° d'imprimeur :2161539C .
24. Karabi .M., (2010). Fonctionnement microbiologique et biochimique des sols sahariens : étude comparative entre sol salés (palmeraies de l'université d'Ouargla) et sol alluvionnaire (palmeraie traditionnelle de Guerrara). Mémoire magister université Ouargla, 76p.
25. Kitouni. M., (2007). Isolement de bactéries actinomycétales productrices d'antibiotiques à partir d'écosystèmes extrêmes identification moléculaire des souches actives et caractérisation préliminaire des substances élaborées. Thèse doctorat : Microbiologie : Université Mentouri-Constantine.
26. Larpent J. P. et Sanglier J. J, (1989).Biotechnologie des antibiotiques. Masson. Paris. 130 pages (31-61).
27. Lechevalier H.A. et Lechevalier M.P., (1981). Introduction to the order Actinomycetales. In : The procaryotes, Eds : Starr M.P., Stolp H., Truper H. G., Ballows A., and Schlegel H.G., Springer-Verlag. Berlin. 2, 1915-1922.

-
28. Lemriss .S ; Laurent .F ; Couble. A ; Casoli .E ; Lancelin J.M ;Saintpierre-Bonaccio D ; Rifai. S ; Fassouane. A et Boiron. P, (2003). Screening of nonpolyenic antifungal metabolites produced by clinical isolates of actinomycetes. *Can J Microbiol*, 49(11): 669–674.
29. Loqman. S, (2009). La lutte biologique contre la pourriture grise de la vigne : Isolement, caractérisation de souches de bactéries Actinomycétales antagonistes à partir des sols rhizosphériques de vignes saines sauvages d'origine marocaine. Thèse de Doctorat en Biologie et Physiologie Végétale. Université de Reims Champagne-Ardenne. France. 216p.
30. Maameri. M, (2007). Caractérisation microbiologique des sols sous conditions semi-arides. (Ksar Chellala) Mémoire.Ing.Agro.Univ. Ibn-Khaldoun, Tiaret.
31. Marchal. N ; Bourdon. J. L, (1991). Les milieux de culture pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries. Doin éditeurs –Paris. 509p.
32. Mariat .F et Sebald .M, (1990). Les actinomycètes. *In* : Bactériologie médicale. Le Minor Edition Médecine-Science. Flammarion. France. 935-949.
33. Morel. R,(1989),in Chaussod.R,(1996),la qualité biologique des sols :Evaluation et implication,étude et gestion des sols,3,4,P.261-278 .
34. Noumeur. S, (2008).Biodégradation du 2,4-dichlorophénol par le microbiote tellurique de la région de Hamla (Batna). Th doctorat : Biologie : Université Mentouri Constantine.
35. Oomah. B. D; Caspar. F; Malcolmson. L. J et Bellido, A.S. (2011). Phenolics and antioxidant activity of lentil and pea hulls. *Food Research International*, 44(1), 436-441.
36. Ouhdouch .Y; Barakate. M; Finanse .C,(2001). Actinomycetes of Moroccan habitats: Isolation and screening for antifungal activities.*Eur. J.Soil Biol.*37:69-74.
37. Paul E. A. et Clark F. E, (1996). Soil microbiology and biochemistry. 2nd edition. Academic Press. San Diego, California (USA), 340.
38. Prescott. L; Harley, J.P; Klein D.A,(2011). Microbiologie tome II. De Boeck, Bruxelles. page 506–517.
39. Quénéa .K ;(2004). Etude structurale et dynamique des fractions lipidiques et organiques réfractaires de sols d'une chronoséquence forêt/maïs (CESTAS, Sud-ouest de la France). Thèse de Doctorat. Université de Paris 6 (France).

-
- 40. Ragunathan. R et Padhmadasi. R, (2013).** Production, purification and characterization of α -amylase using *Streptomyces* spp. PDS1 and *Rhodococcus* spp. Isolated from Western Ghats. Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci 2(8): 206-214.
- 41. Raval, (2012).** Biotransformation of a single amino acid L tyrosine into a bioactive molecule L-DOPA. Int JSci Res, 2: 2250–3153
- 42. Reponen T.A ; Gazenko S.V ; Grinshpun S.A ; Willeke K et Cole E.C,(1998).** Characteristics of airborne actinomycetes spores. Appl. Environm. Microbiol. 64, 3807-3812.
- 43. Sasson. A., (1967).** Recherches éco-physiologique sur la flore bactérienne de sol des régions du Maroc. Série botanique et biologie végétale. Travaux de l'institut scientifique chérifien et de faculté des sciences, rabat, N°30: 27-55.
- 44. Soltner D., (2005).** Les bases de la production végétale. Le sol et son amélioration. Tome I, 24^{ème} édition; collection Sciences et techniques agricoles.
- 45. Theodorakopoulos N., (2013).** Analyse de la biodiversité bactérienne d'un sol contaminé de la zone d'exclusion de Tchernobyl et caractérisation de l'interaction engagée par une souche de *Microbacterium* avec l'uranium. Thèse doctorat : Microbiologie : Université d'Aix- Marseille.
- 46. Tsujibo H; Kubota T; Yamamoto .M; Miyamoto .K et Inamori Y, (2003).**Characterization of chitinase genes from an alkaliphilic actinomycete, *Nocardiopsis prasina* OPC-131. Appl. Environ. Microbiol. 69 (2), 894–900.
- 47. Tuomela. M; Vikman. M; Hatakka. A et Itavaara. M, (2000).** Biodegradation of lignin in a compost environment: a review. Bio resours Technol 7:169–183
- 48. Wei .w et Afr. J Altern. Med, (2014).**YCF1 mediated cadmium resistance in yeast is dependent on copper metabolism and antioxidant enzymes. Antioxid redox signal 21(10):1475-89
- 49. Williams et Cross, (1971).** Isolation, purification, cultivation and preservation of actinomycetes. Methods Microbiol. 4: 295-334.

Références électroniques

1. <http://cultivonsnotreavenir.wordpress.com/2015>.
2. <https://fr.wikipedia.org/wiki/Streptomyces>.

Annexe

I. Composition des milieux de culture et des solutions

1. les milieux de culture :

Caséine amidon agar

- Amidon.....10g
- Caséine.....0.03g
- KNO₃.....2g
- K₂HPO₄.....0.02g
- NaCl.....2g
- MgSO₄ .7H₂O.....2g
- CaCO₃.....0.05g
- FeSO₄.7H₂.....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

Gélose TSI

- Peptone.....15g
- Extrait de viande.....3g
- Extrait de levure.....3g
- Peptone pepsique de viande.....5g
- Glucose.....1g
- Lactose.....10g
- Saccharose.....10g
- Rouge de phénol.....0.05g
- Chlorure de sodium.....5g
- Thiosulfate de sodium.....0.3g
- Agar.....18g
- Eau distillée.....1L
- PH=7,5

Urée indole

- Urée.....2g
- L-tryptophane.....0.3g
- Ethanol à 0,95.....1cm³
- Rouge de phénol.....2.5mg
- Chlorure de sodium.....0.5g
- Dihydrogénophosphate de potassium.....0.1g
- Hydrogénophosphate de potassium.....0.1g
- Eau distillée.....1L
- PH=7

Bouillon Clark et Lubs

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

Milieu d'extraction

- Amidon.....10g
- Na₂ HPO₄.....10g
- Extrait de levure.....5g
- KCl.....0.5g
- MgSO₄.....0.015g
- Eau distillée.....1L
- PH=7

2. Les 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 ou 4,6 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 : 1L
- **Solution Tartarat-Alcaline B** : Tartrate double de sodium et de potassium : 200 ;
Soude : 150 g ; Eau : 1L

2.3. Préparation de biuret

- Sulfate de cuivre $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1,5g
- Tartaratedoule de potassium et de sodium6g
- NaOH30g
- Iode de potassium1g
- H_2O :1L

Résumé

Les actinobactéries représentent une source biologique importante dans la production des enzymes qui sont appliqués dans les industries, telles que l'utilisation des amylases dans la biodégradation de l'amidon. L'objectif principal de notre travail est focalisé sur l'isolement et l'identification de quatre souches d'actinobactéries du sol de la région d'Abd-El-Malak Ramdhan (Mostaganem). Ces souches vont être sélectionnées et caractérisées par des tests physiologiques et biochimiques. Les inoculums des quatre isolats ont été utilisés dans un milieu liquide riche en amidon pour la production des enzymes amylases. Après, l'extraction, l'activité enzymatique des extraits des amylases a été évaluée par des deux méthodes de dosages colorimétriques de Biuret et Liqueur de Fehling effectuées à des longueurs d'ondes $\lambda=540$ nm. Cette évaluation a porté sur la quantification des extraits enzymatiques des souches d'actinomycètes, ainsi que les produits libérés après hydrolyse de substrat (amidon). Cette dernière permet de déterminer les paramètres cinétiques des extraits amyliotiques bruts V_{max} , K_m et V_i . Les résultats obtenus confirment que les quatre isolats d'actinobactéries appartiennent au genre *Streptomyces* sp. Les extraits enzymatiques bruts des souches présentent des concentrations protéiques (0,081 ; 0,101 ; 0,112 et 0,115 mol / l) respectivement pour les quatre isolats (S2, S5, S8 et S9). Cependant, les valeurs du K_m , sont très faibles obtenues respectivement avec les extraits de S2, S5 et S9 ($12,5 \times 10^{-3}$; 7×10^{-3} ; $10,5 \times 10^{-3}$). Les vitesses sont supérieures pour les mêmes souches ($5,2 \times 10^{-3}$; 12×10^{-3} ; $8,2 \times 10^{-3} \text{ mol.l}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$) par rapport à la souche S8 ($k_m=6 \times 10^{-3}$, $V_i=11 \times 10^{-3} \text{ mol.l}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$), dont il est souhaitable de purifier l'enzyme amylase et suivre la croissance des trois souches S2, S5 et S9 sur milieu optimisé, pour bien étudier et déterminer leurs mécanismes de productions pour l'enzyme.

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

Abstract

Actinobacteria represent an important biological source in the production of enzymes that are applied in industries, such as the use of amylases in the biodegradation of starch. The main objective of our work is focused on the isolation and identification of four soil actinobacteria strains in the region of Abd-El-Malak Ramdhan (Mostaganem). These strains will be selected and characterized by physiological and biochemical tests. The inocula of the four isolates were used in a starchy liquid medium for the production of amylase enzymes. After extraction, the enzymatic activity of the amylase extracts was evaluated by two methods of colorimetric assays of Biuret and Fehling Liqueur performed at wavelengths $\lambda=540$ nm. This evaluation focused on the quantification of enzymatic extracts of actinomycete strains, as well as the products released after substrate hydrolysis (starch). This last one makes it possible to determine the kinetic parameters of the raw amyliotic extracts V_{max} , K_m and V_i . The results obtained confirm that the four isolates of actinobacteria belong to the genus *Streptomyces* sp. The crude enzymatic extracts of the strains had protein concentrations (0.081, 0.101, 0.112 and 0.115 mol / l) respectively for the four isolates (S2, S5, S8 and S9). However, the K_m values are very low, obtained respectively with the extracts of S2, S5 and S9 (12.5×10^{-3} , 7×10^{-3} , 10.5×10^{-3}). Speeds are higher for the same strains (5.2×10^{-3} , 12×10^{-3} , $8.2 \times 10^{-3} \text{ mol.l}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$) compared to strain S8 ($k_m=6 \times 10^{-3}$, $V_i=11 \times 10^{-3} \text{ mol.l}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$), which it is desirable to purify the amylase enzyme and monitor the growth of the three strains S2, S5 and S9 on optimized medium, for study well and determine their production mechanisms for the enzyme.

Keywords: *Streptomyces* sp, Amylase, K_m constant; Initial speed V_i .

المخلص

تمثل البكتيريا الإشعاعية مصدرًا بيولوجيًا مهمًا في إنتاج الإنزيمات التي يتم تطبيقها في الصناعات، مثل استخدام الأميلاز في التحلل الحيوي للنشا. الهدف الرئيسي من عملنا هو التركيز على عزل وتحديد أربع سلالات من البكتيريا الشعاعية من التربة في منطقة عبد الملك رمضان (مستغانم). وسيتم اختيار هذه السلالات باختبارات فيزيولوجية والكيمياء الحيوية. تم استخدام لقاح العزلات الأربعة في وسط سائل نشوي لإنتاج إنزيمات الأميلاز. بعد الاستخلاص، تم تقييم النشاط الأنزيمي لمستخلصات الأميلاز بواسطة طريقتين من فحوصات اللونية بيوري و محلول فيهلينغ والتي أجريت عند طول الموجة $\lambda=540$ نانومتر. ركز هذا التقييم على التقدير الكمي للمستخلصات الأنزيمية لسلالات البكتيريا الإشعاعية، وكذلك المنتجات التي تم إطلاقها بعد التحلل المائي (النشا). هذا الأخير يجعل من الممكن تحديد المعلمات الحركية للمستخلصات الأميلازية الخامة وهي السرعة القصوى وثابت ميكاليس والسرعة الابتدائية. تؤكد النتائج التي تم الحصول عليها أن العزلات الأربع للبكتيريا الإشعاعية تنتمي إلى جنس البكتيريا السبحية. كانت المستخلصات الأنزيمية الخامة للسلالات تحتوي على تراكيزات البروتين (0,081، 0,101، 0,112 و 0,115 مول / لتر) على التوالي للعزلات الأربع. ومع ذلك، فإن قيم ثابت ميكاليس منخفضة للغاية مع المستخلصات البكتيرية رقم 5،2 و 9 (12.5×10^{-3} ، 7×10^{-3} ، 10.5×10^{-3}). السرعات عالية من أجل نفس البكتيريا (5.2×10^{-3} ، 12×10^{-3} ، $8.2 \times 10^{-3} \text{ mol.l}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$) بالمقارنة مع بكتيريا رقم 8 (ثابت ميكاليس 6×10^{-3} و سرعة ابتدائية $11 \times 10^{-3} \text{ mol.l}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$). من المستحسن تنقية الأميلاز ومتابعة نمو السلالات الثلاثة رقم 2،5 و 9 في وسط مماثل، من أجل دراسة وتحديد آلية إنتاجها للأميلاز.

الكلمات المفتاحية: بكتيريا سبحية، أميلاز، ثابت ميكاليس، السرعة الابتدائية