



DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

**MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDES**

Pour l'obtention du diplôme de

**MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES**

**Spécialité: MICROBIOLOGIE APPLIQUEE**

Présenté par

**Melle Bensmaine Amina**

**Et Melle Belloumi Amel**

**THÈME**

**Isolement et purification de quelques  
souches d'*Actinomycètes* productrices  
des amylases, et l'évaluation de leurs  
cinétiques enzymatiques**

Soutenue publiquement le ...09/07/2019

DEVANT LE JURY

Président	M. DJIBAOU R.	Grade : Professeur	U. Mostaganem
Encadreur	Mlle F TISSOURAS	Grade : MCA	U. Mostaganem
Examineurs	Mm SEKKAL	Grade :	U. Mostaganem

*Année universitaire 2019-2020*

## **REMERCEMENT**

*Nous tenons à remercier en premier lieu Allah le tout puissant de nous avoir donné le courage et la santé pour achever ce modeste.*

*Nos vifs remerciements et mon grand respect vont à notre directeur de mémoire Mlle **F TISSOURASE**, Maitre de conférences à l'université de Mostaganem pour son encadrement, nous vous remercions pour votre encadrement et votre patience, disponibilité durant la préparation de ce mémoire.*

*Nos remerciements sont adressés aussi aux membres du jury qui ont accepté de juger ce travail*

*Nous tenons à remercier les membres jury :*

***Mr R. DJIBAOU** Professeur à l'université de Mostaganem d'avoir accepté d'examiner ce travail et pour sa contribution dans la confirmation et l'identification des souches qui ont fait l'objet de ce travail.*

*Nos vifs remerciements à **Mme FZ SEKKAL** Maitre de conférences à l'université de Mostaganem d'avoir accepté de présider ce travail.*

*Nous exprimons notre profonde gratitude à tous nos enseignants du département de Biologie.*

*Nos profonds remerciements vont également à toutes les personnes qui nous ont aidés et soutenus de près ou de loin.*

## Liste d'abréviation

**A1,A3,A4, A6,A7:** les Actinobactéries isolées

**Asp 231 :** aspartate acide actif

**C1 :** carbone 1

**CAA :** Caséine amidon agar

**CG :** Guanine, cytosine

**D.O :** Densité optique

**ENDO :** Endo-Amylases

**EXO :** Exo-Amylases

**Glu 261 :** glutamique 261

**HAP :** Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques

**Km :** Constante de Michaelis

**MA :** Mycélium aérien

**MO :** la matière organique

**MS :** Mycélium du substrat

**NR1et 2 :** Réactif de Greiss de test Nitrate réductase.

**PH :** potentiel Hydrogène.

**RM :** Réactif Rouge de Méthyle

**Vi :** Vitesse initiale d'oxydation

**Vmax :** Vitesse maximale d'oxydation

**VP :** Réactif de Voges-Proskauer

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1</b>	Le nombre du microorganisme du sol sur une profondeur de 0à15 cm	07
<b>Tableau 2</b>	Classification des enzymes	18
<b>Tableau 3</b>	Différentes applications des alpha-amylases	31
<b>Tableau 4</b>	Tests physiologiques et biochimiques des isolats d'actinomycètes	33
<b>Tableau 5</b>	Paramètres cinétiques des extraits d'enzymes des isolats de <i>Streptomyces</i> sp	43

## Liste des figures

<b>Figure01</b>	Schéma d'une coupe de sol	02
<b>Figure02</b>	Différentes voies de la transformation de la matière organique	11
<b>Figure03</b>	Cycle de carbone	12
<b>Figure04</b>	Principales étapes du cycle de l'azote	13
<b>Figure05</b>	Principales étapes du cycle de soufre	14
<b>Figure06</b>	Représentation schématique de la structure primaire d'une protéine	17
<b>Figure07</b>	Mécanisme catalytique des hydrolases glycosyliques	20
<b>Figure08</b>	site du prélèvement des échantillons région de Hassi Mameche	21
<b>Figure09</b>	Les points des prélèvements des échantillons	22
<b>Figure10</b>	Protocole expérimental de l'extraction des extraits enzymatiques	26
<b>Figure11</b>	Observations macroscopiques des colonies d'actinobactéries	29
<b>Figure12</b>	purification des isolats des actinomycètes sur milieu caséine amidon	30
<b>Figure13</b>	Coloration de Gram des cinq souches d'actinomycete isolé	32
<b>Figure14</b>	Les résultats des tests d'hydrolyse de la caséine	34
<b>Figure15</b>	Hydrolyse d'amidon	34
<b>Figure16</b>	Hydrolyse de gélatine	35
<b>Figure17</b>	hydrolyse de la Lécithine	35
<b>Figure18</b>	tests réduction des nitrites positif en présence les cinq souches	36
<b>Figure19</b>	les resultat de test TSI des cinq isolat	36
<b>Figure20</b>	résultat de teste catalase des cinq isolats	37
<b>Figure21</b>	Teste de degradation de l'uree	38
<b>Figure22</b>	Tests négatifs d'utilisation de citrate en présence des souches d'actinomycètes	38
<b>Figure23</b>	Tests négatifs de VP et positifs de RM avec les souches d'actinomycetes	39
<b>Figure24</b>	Courbe de la gamme d'étalonnage de la protéine ovalalbumine	40
<b>Figure25</b>	Concertations des extraits protéiques des trois isolats <i>Streptomyces</i> sp	40
<b>Figure26</b>	Courbe de la gamme d'étalonnage du sucre réducteur pur le glucose	41
<b>Figure27</b>	Cinétique du produit libéré par l'action de l'extrait d'amylase de la souche A1	42
<b>Figure28</b>	Cinétique du produit libéré par l'action de l'extrait d'amylase de la souche A3	42

<b>Figure29</b>	Cinétique du produit libéré par l'action de l'extrait d'amylase de la souche A	43
<b>Figure30</b>	Cinétique du produit libéré par l'action de l'extrait d'amylase de la souche A6	43
<b>Figure31</b>	Cinétique du produit libéré par l'action de l'extrait d'amylase de la souche A7	44
<b>Figure32</b>	Cinétique enzymatique de l'extrait d'amylase de la souche A1	45
<b>Figure33</b>	Cinétique enzymatique de l'extrait d'amylase de la souche A3	45
<b>Figure34</b>	Cinétique enzymatique de l'extrait d'amylase de la souche A4	46
<b>Figure35</b>	Cinétique enzymatique de l'extrait d'amylase de la souche A6	46
<b>Figure36</b>	Cinétique enzymatique de l'extrait d'amylase de la souche A7	47

## **Table des matières**

Remerciements

Liste de l'abréviation

Liste des figure

Liste des tableaux.

Introduction 01

### **Partie 1 : Etude bibliographique**

#### **Chapitre I : Généralités sur les sols**

I. Généralités sur les sols	02
1. Définition	02
2. Les diverses phases du sol	03
2.1. Phase liquide du sol	03
2.2. Phase gazeuse du sol	03
2.3. Phase solide du sol	03
3. Les fractions constitutives du sol	04
3.1. Fractions minérale	04
3.2. Fractions organiques	04
4. Différents horizons d'un sol	04
5. Propriétés physiques du sol	05
5.1. Structure	05
5.2. Texture	05

#### **Chapitre II : Présentation bibliographie sur la microflore du sol**

	07
II. Présentation bibliographie sur la microflore du sol	
1. La microflore du sol	07
1.1. Les bactéries	07
1.2. Les champignons	07
1.3. Les actinobactéries	08
1.4. Les algues	08
1.5. Les protozoaires	09
2. Les interactions biologiques dans le sol	09
2.1. Les interactions entre les microorganismes	09

2.2. Les interactions entre les microorganismes et les plantes	10
2.3. Interactions entre la microflore et le sol	10
3. Les intérêts de la microflore dans le sol	11
3.1. Transformation de la matière organique	11
3.2. Cycle de carbone	11
3.3. Cycle de l'azote	11
3.4. Cycle de soufre	13
4. Les actinomycètes	13
4.1. Caractères généraux	14
4.2. la taxonomie des actinomycètes	15
5. Intérêts des actinomycètes	15

### **Chapitre III : Notion sur les enzymes et les amylases**

1. Généralités	17
2. Les structures des enzymes	17
3. Classification des enzymes	17
4. Marché des enzymes	18
5. Présentation des amylases	18
5.1. définition	18
5.2. Caractéristique et propriétés des amylases	19
5.3. les différentes sources et origines de l'alpha-amylase	19
5.4. Mécanisme d'action	20
5.5. Application industrielles	21

### **Chapitre IV : Matériel et méthodes**

1. L'objectif global	22
2. Protocole expérimental général	22
3. Sites de prélèvement de l'échantillon	22
4. Isolement des actinomycètes	23
4.1. Le milieu de culture	23
4.2. Préparation des dilutions	23
5. Purification et conservation des isolats	23
6. Identification morphologiques des actinobactéries	24
6.1. Aspect macroscopique	24
6.2. Aspect au microscope optique	24

	24
7. Identification physiologique	
7.1. Hydrolyse de l'amidon	24
7.2. Hydrolyse de la caséine	24
7.3. La dégradation l'urée	25
8. Identification biochimiques	25
8.1. Test de catalase	25
8.2. La dégradation de la gélatine	25
8.3. Recherche de lécithinase	25
8.4. La réduction de nitrate réductase	25
8.5. Les réactions VP et RM	26
8.6. La production de H <sub>2</sub> S et fermentation le glucose et lactose	26
8.7. L'utilisation de citrate	26
9. Fermentation et production des amylases	27
9.1. Préparation d'inoculum	27
9.2. La fermentation submergée	27
9.3. Extraction l'extraction brute des amylases	28
9.4. Dosage colorimétrique des extraits enzymatiques par la méthode de Biuret	28
9.5. Étude cinétique des extraits enzymatiques	28
9.5.1. Préparation de la gamme d'étalonnage du glucose	28
9.5.2. La cinétique des extraits enzymatiques	29

## **Chapitre IIV Résultats et Discussion**

IIV. Résultats et discussion	30
1. Purification des actinomycètes	30
2. Caractérisations morphologiques de la souche actinomycète	32
3. Tests physiologiques et biochimiques	33
3.1. Hydrolyse de la caséine	34
3.2. Hydrolyse d'amidon	35
3.3. Hydrolyse de gélatine	35
3.4. Recherche de lécithinases	36
3.5. Réduction des nitrates	36
3.6. Recherche de catalase	37
3.7. Recherche de catalase	37

	37
3.6. Production de sulfure d'hydrogène (H <sub>2</sub> S) et fermentation des sucres	
3.8. Dégradation l'urée	38
3.9.L'utilisation de citrates	39
3.10. La réaction de VP et RM	39
4. Production des extraits enzymatique des isolats des actinomycètes	40
4.1. Dosage des extraits enzymatiques par la réaction de Biuret	40
4.2. Cinétique des extraits d'amylasiques des isolats des <i>Actinomycètes</i>	41
4.3. Mesure des paramètres cinétiques	44
Conclusion	49
Référence	50
Annex	
Résumé	

# *Introduction*

## **Introduction**

Le nombre important des microorganismes du sol constituent la biodiversité de l'écosystème terrestre. Cette biodiversité microbienne reste encore mal connue et exploitée. Elle est essentiellement constituée par les bactéries et les champignons. Dans un gramme de sol une existe une multitude de cellules microbiennes actives dont plus de  $10^8$  /g. (**Moreaux, 1973 ; Raoul, 2013 ; Hoorman et Islam, 2010**). Parmi ces microorganismes les actinomycètes sont des bactéries à Gram positif, saprophytes, l'abondance et l'activité des actinomycètes dans le sol sont influencés par plusieurs facteurs, la disponibilité des nutriments, la nature et l'abondance de la matière organique, la salinité, la teneur en humidité relative, la température, le pH et la végétation du sol.

Il existe de différents genres d'actinomycètes présentant une source importante de plusieurs métabolites d'intérêts industriels. Il a été rapporté que ce genre et spécialement les Streptomyces sont très reconnus pour leurs enzymes industrielles telles que les pectinases, les cellulases, les protéases, les chitinases, les xylanases et les amylases. Ces enzymes sont très utilisées dans les domaines (agroalimentaires, pharmaceutiques, cosmiques et chimiques). Dans ce contexte le présent travail est focalisé. Il est structuré en deux parties, dans un premier temps, une synthèse bibliographique a été effectuée pour cerner la problématique et élaborer le protocole expérimental. Dans cette partie les données bibliographiques ont été répartir en trois chapitres, définissant le sol et sa microflore, suivi d'une présentation des enzymes et leurs multiples intérêts. Cette synthèse a permet de définir les objectifs et la méthodologie d'étude qui résume : l'isolement et la purification des actinomycètes, l'identification et caractérisation par des tests physiologiques et biochimiques, 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 :*  
*Généralité sur le sol*

## I. Généralités sur les sols

### 1. Définition

Les sols sont des systèmes multiphasiques complexes et hétérogènes, composés d'air, d'eau et de particules solides (sable, limon, argile, matière organique (MO), nutriments etc.). En outre, les sols sont des médias ouverts et dynamiques, échangeant de la matière et de l'énergie avec l'atmosphère, la biosphère et l'hydrosphère (Sposito, 1997). Selon Nortcliff, (2002), ils doivent accomplir cinq fonctions principales :

- Offrir un habitat physique, chimique et biologique pour les organismes vivants ;
- Réguler les flux d'eau, le stockage et le recyclage des cycles des nutriments et d'autres éléments ;
- Maintenir les activités et les diversités biologiques pour subvenir à la croissance des plantes et la productivité des animaux ;
- Filtrer, tamponner, transformer, immobiliser et détoxifier les substances organiques et inorganiques ;
- Fournir un support mécanique aux organismes vivants et à leurs structures.

D'après Duchaufour, (1984) et Boulaine, (1989), l'épaisseur du sol peut varier de quelques centimètres à plusieurs mètres. Il résulte de plusieurs facteurs au cours du temps, comme la transformation de la roche-mère sur laquelle il s'est développé, des facteurs environnementaux tels que le climat, le relief et la végétation (fig. 1).

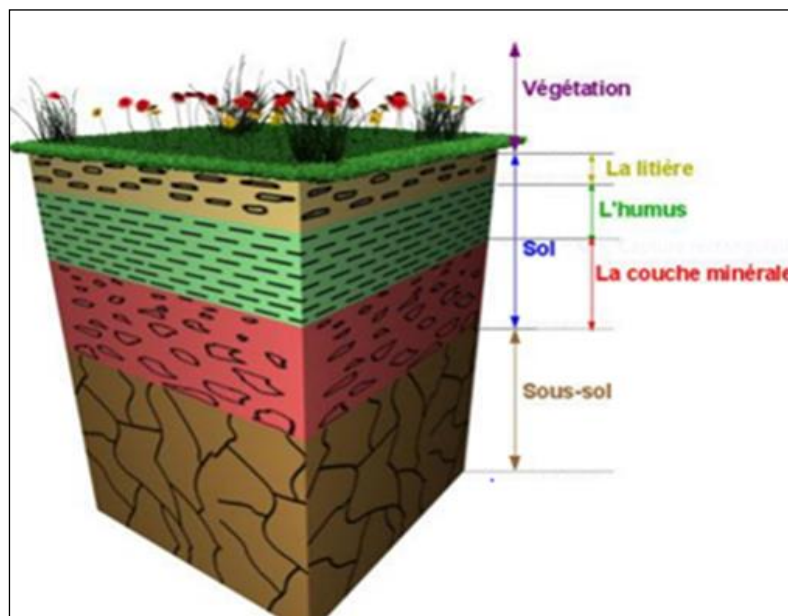


Figure1: Schéma d'une coupe de sol

## **2. Les diverses phases du sol**

### **2.1. Phase liquide du sol**

La phase liquide du sol est souvent désignée par le terme « solution du sol », occupe une partie plus ou moins importante de la porosité du sol, est constituée d'eau où se trouvent diverses substances organiques et minérales dissoutes et des particules en suspension) (**Duchaufour, 1984**). La composition de la solution du sol varie selon :

- Le climat ;
- Les apports anthropiques (fertilisants, produits de traitement phytosanitaire etc.) ;
- L'activité biologique du sol (exsudats racinaires, produits de synthèse et de dégradation microbienne etc.).

### **2.2. Phase gazeuse du sol**

D'après **Calvet (2003)**, dans un sol bien aéré, les gaz qui règnent dans l'atmosphère du sol sont :

- L'azote (78 à 80%) ;
- L'oxygène (18 à 20%) ;
- Le dioxyde de carbone (0,2 à 3%).

D'autres molécules gazeuses d'origine anthropique telles que les pesticides ou les HAP (**Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques**) peuvent également être détectées dans l'atmosphère du sol. Ces gaz peuvent exister dans le sol soit à l'état libre ou dissous dans la solution du sol. Cependant, dans certaines conditions ; la phase gazeuse peut être absente. Tout l'espace poral du sol est occupé par l'eau et le sol (sol saturé) (**Duchaufour, 1984 ; Hillel, 1982 ; Calvet, 2003**).

### **2.3. Phase solide du sol**

**Calvet (2003)**, rapporte dans ses travaux que la phase solide du sol est en totalité minérale et elle comprend :

- **Éléments grossiers** : Ce sont des éléments > 2 mm et on les classe par dimensions (0,2 à 2 cm graviers ; 2 à 5 cm cailloux ; 5 à 20 cm pierres ; > 20 cm blocs.).
- **Terre fine** : C'est la fraction de terre qu'il reste lorsqu'on retire les éléments grossiers (donc < 2 mm, au tamis). On peut classer les éléments de la terre fine par dimensions (2mm à 0,2 mm sable grossiers ; 0,2mm à 50 µm sable fins ; 50 µm à 20 µm limons grossiers ; 20 µm à 2 µm limons fins ; < 2 µm argiles). Elle comprend aussi une fraction organique dont le taux varie selon le type de sol et les conditions de pédogenèse. Les sols cultivés présentent des taux de matières organiques compris dans une gamme allant de 1 à 20% de la masse du sol

### **3-fractions constitutives du sol**

Le sol contient deux fractions intervenant principalement dans la constitution du sol sorption des polluants à savoir les fractions organiques et minérales (**Pansu et Gautheyrou, 2001**)

#### **3.1. Fractions minérales**

Selon **sposito (2008)**, il existe trois catégories dans le sol :

- **Les silicates :** Ce sont des oxydes de silice qui ont des structures très diverses (Unités isolées (olivine  $(\text{Fe, Mg})_2 [\text{SiO}_4]$ ); Chaîne (pyroxène  $(\text{Mg, Fe})_2(\text{SiO}_3)_2$ ) ; Feuillet (smectite) et sont souvent associés à des cations métalliques tels que l'aluminium, le fer ou le magnésium.
- **Les oxydes, oxy-hydroxydes et hydroxydes :** Ils sont les plus importants et abondants dans les sols, la gibbsite (oxyde d'aluminium  $\text{Al}(\text{OH})_3$ ), La goethite et l'hématite (oxydes de fer  $(\text{FeO-OH}), (\text{Fe}_2\text{O}_3)$ ), la birnessite et la lithiophorite (oxydes de manganèse).
- **Les carbonates :** Les plus abondants sont les carbonates de calcium (Calcite) et les carbonates de magnésium (Dolomite  $(\text{Ca, Mg}) (\text{CO}_3)_2$ ). Ceux-ci peuvent Co-précipiter avec d'autres métaux (exemple : calcite magnésienne) ou former un revêtement sur d'autres minéraux en changeant ainsi leurs propriétés de surfaces.

#### **3.2. Fractions organiques**

En ce qui concerne la phase organique du sol, elle correspond à tout ce qui est constitué de carbone organique issue des êtres vivant ou non (insectes, plantes, humus, microorganismes etc.) (**Pansu et Gautheyrou, 2001**). L'humus est un terme qui regroupe l'ensemble de la matière organique non vivante du sol et qui peut être classé en deux catégories :

- **Substances non humiques :** Correspondent à la fraction de matière organique dont les caractéristiques bio physicochimiques sont reconnaissables (ex les hydrates de carbone, les protéines, les acides aminés, les lipides etc.).
- **Substances humiques :** Ils sont issus de la transformation chimique ou biologique (altération, polymérisation etc.) de la matière organique du sol.

### **4. Différents horizons d'un sol**

Les différents processus d'altération, d'humidification et de différenciation du sol aboutissent à l'apparition de couches superposées plus ou moins distinctes et différents selon la texture, la structure et la composition chimique. Ces couches correspondent aux horizons eux mêmes peuvent être déclinés en différents sous horizons en fonction du type de sols dont l'ensemble constitue le profil. On distingue quatre horizons majeurs (**Baize et Jabiol, 1995**).

- **L'horizon A** est un horizon majeur occupant la partie supérieure du profil (0- 50 cm) et présentant une quantité importante de matière organique et une faible quantité en argile, fer et aluminium. Cette matière organique provient des plantes en phase de décomposition
- **L'horizon S** situé au-dessous de l'horizon A (50-90 cm), il est le lieu d'altération des minéraux primaires, de libération des oxy-hydroxydes de fer et de décarbonatation etc.
- **L'horizon B** est situé au-dessous de S (90-150 cm), il est caractérisé par des teneurs en argile, fer et humus plus élevées que les horizons A, S et C. La matière organique présente dans cet horizon provient de l'horizon supérieur (A). Elle est adsorbée sur les argiles et les oxydes de fer et d'aluminium.
- **L'horizon C** est situé au-dessous de B (au-dessous de 150 cm) riche en minéraux avec une faible teneur en matière organique.

## **5. Propriétés physiques du sol**

### **5.1. Structure**

La stabilité structurale dépend de la MO des sols, le complexe argilo-humique joue un rôle structurale, son importance est en fonction des teneurs en eau du type d'argile sol. La matière organique augmente la stabilité des agrégats, une mauvaise structure peut empêcher l'écoulement des eaux dans le sol et les échanges gazeuses avec l'atmosphère. Une bonne structure va assurer une grande circulation d'eau et assure une bonne germination, aération et pénétration profondes des racines, ce qui facilite l'exploration des ressources nutritives du sol (**Soltner, 2004**).

### **5.2. Texture**

La texture du sol présente une propriété de base, elle traduit de manière globale la composition granulométrique de la terre fine (**Gobat et al., 2010**).

La texture est un caractère fondamental du sol, car elle influe sur plusieurs paramètres :

- **Perméabilité du sol à l'eau et à l'air** : La perméabilité est indépendante du taux de la matière organique. Le critère retenu pour mesurer la perméabilité est la vitesse de percolation de l'eau exprimée en  $\text{cm}^3/\text{h}$ . Le taux élevé de la matière organique n'implique pas une bonne perméabilité (**Redlich et al., 1975**).
- **Rétention de l'eau** : Sous forme de vapeur ou liquide, l'eau occupe environ un quart du volume d'un sol, quand ce dernier est saturé, l'eau qui percole à travers une tranche du sol le fait sous l'influence de la gravité (**Koller, 2004**). La teneur en air est complémentaire de la teneur en eau, puisque ces deux fluides se partagent l'espace poreux (**Blanc, 1985**).

**Porosité** : La porosité d'un sol est une grandeur physique qui exprime le rapport entre le volume

occupé par ses pores et son volume totale. Considérons un échantillon de matériau terreux. Soient le volume total de cet échantillon qui est qualifié d'apparent puisque c'est

- le volume qui est directement aperçu et vs le volume occupé par les particules du sol. **(Calvet, 2003).**
- **Connectivité :** Elle exprime l'importance des connexions entre les pores qui est un élément déterminant de la continuité de la phase gazeuse (l'écoulement de l'air) **(Boudouch, 2009).**

## *Chapitre II :*

*Présentation bibliographie sur la  
microflore du sol*

## II. Présentation bibliographie sur la microflore du sol

### 1. La microflore du sol

Les microorganismes du sol sont constitués de 5 principaux groupes : les virus, les algues, les champignons, les bactéries et les actinobactéries. Toutefois, ces trois derniers groupes représentent définissent la quantité et la qualité essentielle de la biomasse microbienne du sol (tab.1) (**Lavelle et Spain, 2001 ; Focht et Martin, 1979**).

**Tableau 1:** Le nombre du microorganisme du sol sur une profondeur de 0 à15 cm (**Hoorman et Islam, 2010**).

Microorganismes	Nombre germe /g sol	Biomasse (g/m <sup>2</sup> )
Bactéries	$10^8 - 10^9$	40-500
Actinomycètes	$10^7 - 10^8$	40-500
Champignons	$10^5 - 10^6$	100-1500
Algues	$10^4 - 10^5$	1-50
Protozoires	$10^3 - 10^4$	Variée

#### 1.1. Les bactéries

Ce sont des être vivants avec une morphologie simple, de taille inférieur de 0,5 à 3 µm. Elles diffèrent des autres microorganismes par leurs nature procaryote (absence du noyau différencié).

Leur comportement physiologique est très varié, certaines peuvent réaliser des réactions chimiques dont les être vivants sont incapables (**Messiaen et al., 1991**). La répartition des divers microbes dans le sol est variable suivant la nature du terrain (**Cornil, 1890**). Les bactéries interviennent dans un grand nombre de processus, et interactions mutualistes ou antagonistes avec les autres organismes du sol. Elles jouent un rôle fondamental dans les cycles : de l'azote (ammonification, nitrification, dénitrification, fixation symbiotique de N<sub>2</sub>); du carbone (la décomposition et la minéralisation); du phosphore ; du soufre et dans le recyclage des déchets et des polluants comme les pesticides (**Toop et al., 1997 ; Leung et al., 1997**).

#### 1.2. Les champignons

Les champignons sont des eucaryotes dotés d'une structure filamenteuse végétative appelée mycélium. La plupart sont des eumycètes, ils ont une membrane chitineuse, et leur organe reproducteur est dépourvu de flagelles. Les eumycètes sont constitués de quatre principaux

groupes qui diffèrent par la structure de leur mycélium et de leur organe reproducteur survivant dans le sol. On a les Zygomycètes, les Ascomycètes, les Basidiomycètes et les Deutéromycètes (**Lavelle et Spain, 2001**). Elles présentent une grande diversité, des études récentes estiment le nombre d'espèces à 1,5 Millions approximativement (**Hawks worth et Mound, 1991**).

Les champignons sont souvent dominants dans les sols naturels en termes de biomasse. Dans certains sols, leur biomasse qui constitue une portion importante du pool de nutriment, peut être plus importante que celle de tous les autres microorganismes, des plantes et des animaux (**Anderson et al., 1978**).

Cependant, les champignons jouent des rôles très importants dans les cycles des nutriments du sol comme les autres microorganismes notamment dans la décomposition de la matière organique (**Thom, 1997 ; Bloem et al., 1994**). Ils sont aussi impliqués dans les chaînes alimentaires complexes du sol, par leurs interactions trophiques (mutualistes : mycorhizes, champignon-termites ; commensales ; compétitives) avec la faune et les autres microorganismes du sol (symbioses, parasites ou prédateurs). Les champignons jouent un rôle dans le recyclage des déchets, des sécrétions chimiques et excréments des racines des plantes, des animaux et des microorganismes (**Moore et de Rooter, 1991**).

### **1.3. Les actinobactéries**

Ce sont des bactéries filamenteuses hétérotrophes et la plupart sont de Gram-positifs. Ces bactéries possèdent un mycélium ramifié dont le diamètre varie de 0,5 à 1  $\mu\text{m}$ . Il est plus fin que celui des champignons (**Berthelin et Toutain, 1979**). Leur classification est basée sur la structure de l'appareil végétative (bâtonnets ou Mycéliums), le mode de reproduction (fragmentation, formation de conidies végétative ou sporangiospores sexuel) etc.

Les actinomycètes sont des décomposeurs primaires des matières végétales résistantes comme l'écorce, les feuilles et les tiges. Ils sont efficaces dans la dégradation de la cellulose, de la chitine, et de la lignine. D'après certains auteurs, les espèces du Genre *Frankie* forment des symbioses fixatrices d'azote en associations avec les casuarinacées et d'autres plantes supérieures (**Stolp, 1988 ; Normand et al., 2000; Lavelle et Spain, 2001**). Encore, les actinomycètes jouent dans le sol un rôle important, elles peuvent produire des substances des vitamines et des antibiotique ou même des toxique (**Clement et Lozet, 2011**).

### **1.4. Les algues**

Les algues sont des photo-autotrophes se présentes sur la surface du sol ou en subsurface pour recevoir un minimum de la lumière qui est nécessaire pour assurer la photosynthèse. Elles sont de l'ordre de 5000 à 10000 cellules/g de sol. Certaines sont hétérotrophes qui (euglènes) peuvent

vivre en profondeur. De nombreuses algues présentent une couche mucilagineuse qui peut abriter de nombreuses bactéries (**Maier et al., 2000**).

Quatre groupes majeurs sont retrouvés dans le sol, il s'agit des algues vertes, vert-jaunes, rouge et des cyanobactéries. Elles participent aux processus de formation de sol et certaines espèces ont la capacité de fixer l'azote (**Wild, 1993**).

### **1.5. Les protozoaires**

Les protozoaires font partie de la règne des protistes, sous-règne des protozoaires. Trois embranchement existent dans le sol est son t importants : les *Zoomastigophores* ou *zooflagellés*, les Rhizopodes et les ciliés. Ce sont des êtres unicellulaires eucaryotes, leurs mode de reproduction est asexuée. Ils donnent un très grand potentiel biotique (capacité maximale de prolifération d'une espèce). Leurs tailles font partie de la microfaune (3 µm, parfois jusqu'à 3mm). Plus de 80000 espèces qui sont connues dont leurs habitas diffèrent, eau interstitielle du sol et eau pelliculaire à la surface des agrégats. Ils mènent un mode de vie libre, mais il ya des espèces parasites et symbiotique dans le sol (**Gobat et al., 2010**).

## **2. Les interactions biologiques dans le sol**

Il existe une diversité d'interactions dans le sol (symbiose, parasitismes, compétition, Prédation). Ces relations avec les composants biotiques et abiotiques constituent la base de la biologie (**Trévors et Van Elsas, 1997**).

### **2.1. Les interactions entre les microorganismes**

Dans les conditions naturelles un microorganisme isolé n'existe pas, ainsi quand une cellule microbienne est isolée en laboratoire, l'individu se multiplie normalement pour former un groupe ou clone, ou bien des individus identiques, on parle dans ce cas de population (**Atlas et Bartha, 1993**). Ils existent dans l'environnement beaucoup de populations à caractères différents. Les populations microbiennes qui vivent dans un même habitat interagissent entre eux pour former une communauté microbienne. Cette dernière est structurée, et/ou chaque population contribue à son maintien. D'après, **Atlas et Bartha, (1993)**, des interactions apparaissent entre les individus à l'intérieur de la même population et entre diverses populations à l'intérieur de la communauté.

Les interactions entre populations microbiennes peuvent être négatives (compétition, amensalisme), positives (commensalisme, synergique et mutualisme), ou positives pour l'un et négatives pour l'autre population (parasitisme ou prédation). De nombreux exemples existent, comme l'interaction amensale entre microorganismes : l'inhibition des champignons pathogènes *Gaeumannomyces graminis* des racines du blé par *Pseudomonas fluorescents*, due à la production d'antibiotique du type phénicien (**Thomashow et al., 1990**).

## **2.2. Les interactions entre les microorganismes et les plantes**

Ces interactions entre les microorganismes et les plantes peuvent être symbiotiques ou non. D'après **Tate, (1995)**, le développement de la microflore rhizosphérique a de multiples impacts direct ou indirect sur la production de biomasse de la plante. Beaucoup de bactéries des rhizosphères produisent des composés organiques qui permettent le développement du système racinaire des plantes. Elles sont responsables du recyclage et de la solubilisation des éléments minéraux (azote, phosphore, calcium); de la synthèse des vitamines, des acides Aminés, des phytohormones telle que les auxines qui stimulent la croissance des plantes ou bien d'autres substances qui peuvent inhiber les organismes pathogènes des plantes (**Focht et Martin, 1979; Kwon et al.,2009 ; Tate, 1995; Lavelle et Spain, 2001**).

Les effets indirects résultent de l'effet de la microflore rhizosphérique sur la structure du sol. Les microorganismes synthétisent des polysaccharides qui cimentent les particules minérales du sol qui augmente l'agrégation et améliore la structure, l'aération et l'infiltration de l'eau dans sol, ce qui un bon enracinement (**Tate, 1995**). Il peut exister une compétition négative ou positive entre les microorganismes et les racines des plantes pour l'azote qui est un élément important pour la croissance des plantes et des microorganismes. Dans les sols pauvres, cet élément constitue un facteur limitant. Certains bactéries et champignons peuvent envahir les tissus des racines et provoquent de nombreuses maladies (nécrose, de pourritures, de troubles vasculaires, de tumeurs et ou de lésions) (**Sorensen, 1997**).

Actuellement, plusieurs équipes de recherches dans le monde travaillent sur les bactéries rhizosphériques stimulatrices de PGPR (plant Growth-promoting rhizobacteria). Il s'agit d'un sol qui est situé au voisinage des racines des plantes et qui se caractérise par la présence d'exsudats racinaires (rhizodépôts), les bactéries PGPR colonisent la rhizosphère en utilisent les exsudats racinaires comme substrats nutritifs, mais à la différence des autres bactéries rhizosphériques, elle ont en retour un effet bénéfique sur la plante via une multitude de mécanismes (**Young et Crawford, 2004**).

## **2.3. Interactions entre la microflore et le sol**

L'hétérogénéité des microorganismes détermine la structure et les caractéristiques du sol. Cette structure joue un rôle important dans la circulation de l'air et de l'eau le sol. Elle facilite aux plantes et aux microorganismes d'extraire l'eau et la diffusion de certains composés à travers la matrice du sol (**Young et al., 2001**).

Les mycéliums extra-racinaires des champignons mycorhiziens à arbuscules, favorisent l'agrégation des particules des sols et l'apport en eau et aux minéraux. Cela contribue à la disponibilité des nutriments essentiels tels que le phosphate et l'azote qui jouent un rôle important

dans la croissance des plantes mais également des microorganismes présents dans le sol (**Subramanian et Charest 1998; Six et al., 2004**). En parallèle, les caractéristiques physico-chimiques des sols tels que l'humidité, la texture, le pH et la matière organique présentent un impact sur les aspects morphologiques et physiologiques des microorganismes et sur leurs activités biologiques (**Lundquist et al., 1999**).

### 3. Les intérêts de la microflore dans le sol

Dans le sol les microorganismes assurent plusieurs fonctions, ils participent dans la synthèse et la décomposition la matière organique et interviennent aussi dans les différentes étapes des cycles biogéochimiques.

#### 3.1. Transformation de la matière organique

Quelque soit l'origine de la matière organique (végétale, animal ou microbienne etc.) dans le sol, la microflore peut la transformation grâce aux divers processus physicochimiques et biochimiques. Cette transformation est basée sur quatre principales étapes (fig. 2) (**Duchaufour, 1983**).

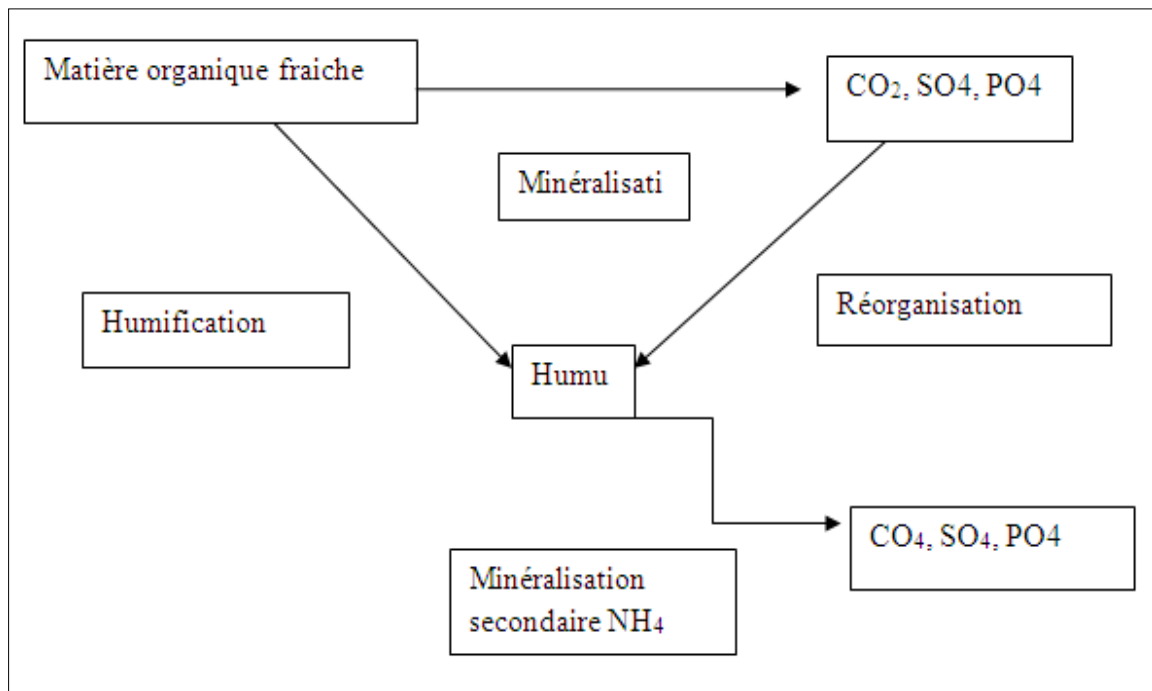


Figure 2: Différentes voies de la transformation de la matière organique (**Duchaufour, 1983**).

### 3.2. Cycle de carbone

Le cycle du carbone présente la transformation continue du carbone organique au carbone minéral. Au cours de cette transformation, plusieurs phénomènes peuvent exister tels que la dégradation, la minéralisation et l'humification. Ces grandes étapes sont illustrées dans la figure ci-dessus (Dommergues et Mangenot, 1970).

### 3.3. Cycle de l'azote

Les composés azotés organiques (animaux ou végétaux) subissent une décomposition (ammonification) microbienne en formant l'ammoniac. Ce dernier est converti en nitrites et en nitrates grâce à l'action des microorganismes « nitrosomonas, nitrobacter », cette phase est la nitrification (Leclerc *et al.*, 1977). Le cycle de l'azote connaît en fin une autre phase importante qui est la dénitrification, la réduction de nitrates en azote grâce à l'action de nouveaux micro-organismes tels que *Thiobacillus* dénitrifiant ou microcoques dénitrifiants (fig.4).

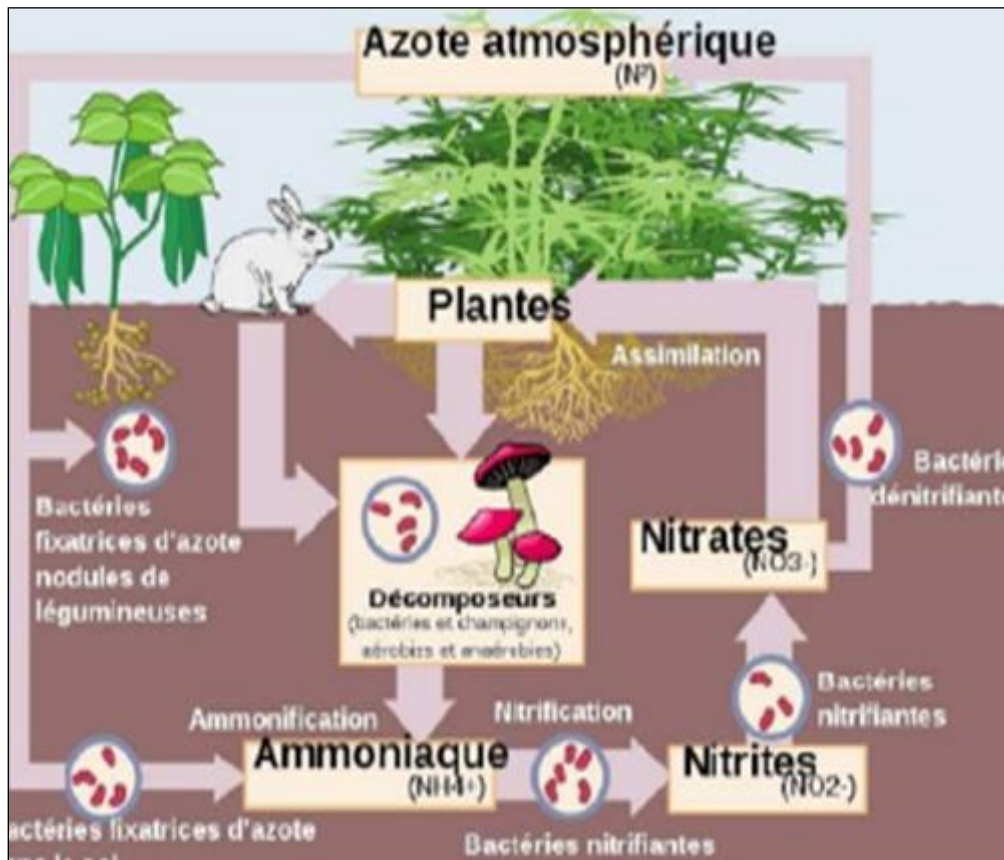


Figure 4 : Principales étapes du cycle de l'azote (Leclerc *et al.*, 1977 In Habib et Missoum, 2011)

### 3.4. Cycle de soufre

Le soufre est un élément indispensable à la nutrition des plantes. Il entre dans la composition de différents acides aminés tels que la méthionine et la cystine, et dans d'autres facteurs de croissance

comme la thiamine et la biotine. La partie majeure du soufre se trouve sous des formes organiques.

La transformation biologique du soufre passe par quatre étapes essentielles (fig. 5).

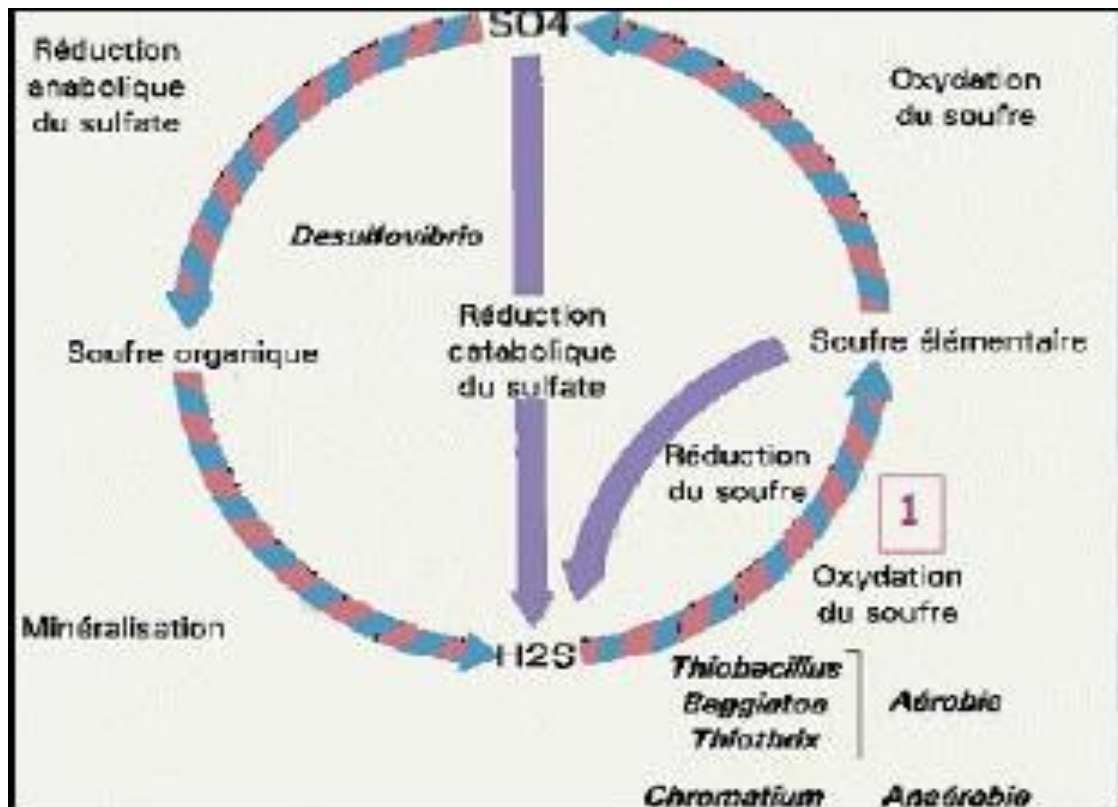


Figure 5: Principales étapes du cycle de soufre (Habib et Missoum, 2011).

- **La minéralisation du soufre organique** : Les produits de la minéralisation du soufre organique sont soit des sulfates, des sulfures ou des composés soufrés volatils.
- **L'immobilisation** : C'est l'incorporation des cellules microbiennes de ces composés soufrés dans.
- **L'oxydation** : L'oxydation des composés minéraux du soufre peut être de nature chimique ou biologique (l'oxydation microbienne).
- **La réduction** : Réduction des sulfates ou sulfo-réduction.

## 4. Les actinomycètes

### 4.1. Caractères généraux

Les actinomycètes sont des bactéries à Gram positif, ce sont des saprophytes, largement distribués dans le sol, l'eau. Toutefois, les actinomycètes présentent des similitudes avec les eubactéries et les champignons, les diamètres des filaments des formes mycéliennes est deux fois plus faible (0,5 à 1,2  $\mu\text{m}$ ) que celui des champignons. Il existe des formes de transition, mycéliennes typiques et unicellulaires, présentant une aptitude peu marquée à former un mycélium ramifié. La plupart des actinomycètes sont terrestres, certaines espèces sont marines (**Mincer *et al.*, 2002**). La plupart des espèces d'actinomycètes sont chimio-organotrophes, aérobies, mésophiles, leurs gamme de pH est de pH 5,0 à 9. L'activité des actinomycètes dans le sol est influencé par plusieurs facteurs importants qui sont : la disponibilité des nutriments, la nature et l'abondance de la matière organique, la salinité, la teneur en humidité relative, la température, le pH et la végétation du sol (**Goodfellow et Williams, 1983 ; Goodfellow et O'donnell, 1989**).

### 4.2. La taxonomie des actinomycètes

Les actinomycètes subdivisent en quatre familles (**Stanier, 1966**):

- A. **Les Mycobactériacées** : La morphologie des **mycobactériacées** rapproche de celle des bactéries, elles présentent des affinités marquées avec les corynébactériacées et les bactéries lactiques. Ils se différencient des autres par leur acido-résistance, à l'exception de certains *Nocardia*.
- B. **Les Actinomycétacées (ou proactinomycètes)** : Cette famille représentée par les genres *Nocardia* et *Actinomyces* occupe une position intermédiaire entre les mycobactériacées caractérisées par une structure bactérienne et les *Streptomycétacées* caractérisées par une structure pseudo mycélienne.
- C. **Les Streptomycétacées** : Cette famille est caractérisée par une structure mycélienne permanente. La reproduction se fait par conidies. Il se distingue des *Nocardia* par leur mycélium végétatif persistant et une reproduction par des conidies en chaîne.
- D. **Les actinoplanacées** : Les espèces appartenant à cette famille ont un cycle qui présente un stade mobile (sporangiospores mobiles). Le genre *Actinoplanes* est aquatique.

D'après **Stackebrandt ,Rainey §Ward Rainey 1997**; les actinomycètes sont classés dans le taxon

suivant :

- REGNE : Bacteria
- DIVISION : Actinobacteria
- CLASSE : Actinobacteria
- SOUS CLASSE : des actinobacterales
- ORDRE : actinomycétales

### 5. Intérêts des actinomycètes

Les actinomycètes présentent de multiples intérêts et dans les différents domaines (agronomique, industriel, pharmacologique, agroalimentaire, etc.) (**Kumar *et al.*, 1999**)

**Rôle dans le sol :** La densité des actinomycètes est représentés principalement par les genres *Nocardia* et *Streptomyces*. La présence actinomycètes dans le sol est trois jusqu'à 5 plus faible que celle des bactéries. Leur densité augmente dans les sols alcalins et décroît dans les sols submergés. Leur rôle dans le sol est important, ils ont la capacité de dégradation des substances organiques non biodégradables par les autres organismes du

- sol, et à produire des substances probiotiques et antibiotiques (**Kieser *et al.*, 2000**).
- **Production des antibiotiques :** Les actinomycètes sont classés parmi les premiers microorganismes producteurs d'antibiotiques. Deux tiers de six mille antibiotiques isolés jusqu'ici sont produits par les actinomycètes. **Waksman** fut le premier qui a isolé les quatre des premiers antibiotiques utiles: l'actinomycine; la streptomycine; la néomycine et la candididine ayant des propriétés pharmacologiques intéressantes en tant que antibactériens, antifongique ou ligand des stéroïdes. Les enzymes sont les plus importants produits des actinomycètes après les antibiotiques, certaines sont utilisées dans l'industrie alimentaire (isomérase du glucose), et dans celle des détergents (protéases).
- **La solubilisation des phosphates :** sur les champs, ce substrat est susceptible d'être solubilisé par l'action de microorganismes le phosphore dans le sol est de 0,05% (p/p), une très faible proportion des phosphates est disponible aux plantes. La grande partie est complexée par l'aluminium, le calcium et le magnésium.
- **La production de phytohormones :** Les phytohormones sont de petites molécules régulatrices de la croissance végétale qui stimulent la croissance et le développement en au cours de la division, l'élongation et la différenciation cellulaires, la régulation de l'activité enzymatique et l'induction de la germination des racines.

# *Chapitre III :*

## *Notions sur les enzymes et les amylases*

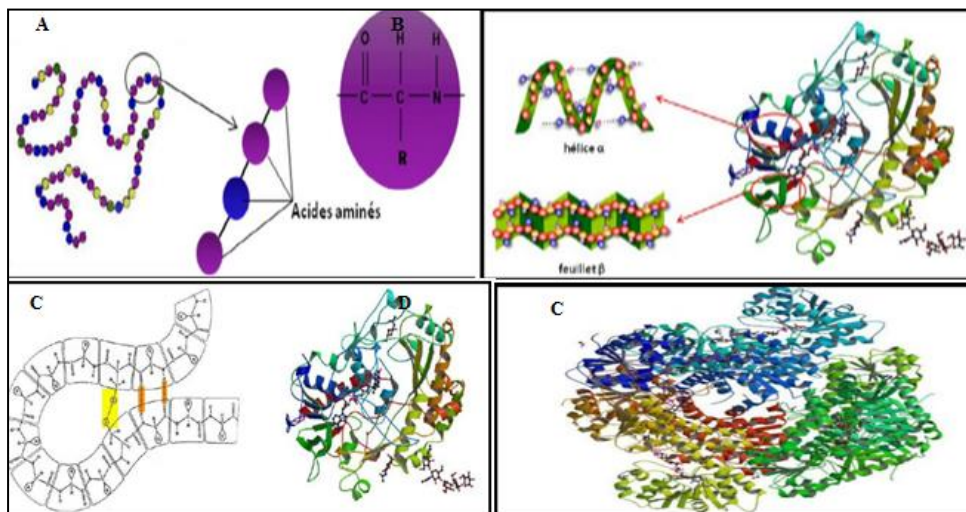
## 2. Notions sur les enzymes et l'*alpha*-amylase

### 1. Généralités

Les enzymes sont des macromolécules de nature protéique. Elles sont constituées de plusieurs acides  $\alpha$ -aminés de la série L, unis par une liaison peptidique amide entre le premier groupement carboxyle d'un acide aminé et le groupement aminé du deuxième acide. Leurs masses moléculaires élevées varient entre 10 à 1 000 kDa (Vincent, 1996).

### 2. Les structures des enzymes

Les acides aminés constituant des enzymes sont arrangés dans de différentes structures. Les protéines de structures primaires présentent un arrangement des acides aminés linéaire (fig. 6, A). Ces protéines vont avoir tendance aussi à se replier sur elles-mêmes, afin de former des arrangements secondaires de forme hélices  $\alpha$  et feuillets  $\beta$  (fig. 6, B). Cette structure est stabilisée grâce aux liaisons d'hydrogènes, l'arrangement de ces structures secondaires les unes par rapport aux autres forme une structure tertiaire par des ponts disulfures (fig. 6, C). Pour les grandes molécules d'enzymes une structure dite quaternaire peut exister.



**Figure 6 :** Représentation schématique de la structure primaire d'une protéine (Vincent, 1996).

Ces différentes structures tridimensionnelles de l'enzyme donnent une spécificité vis-à-vis les substrats et en particulier le site actif.

### 3. Classification des enzymes

Le pouvoir catalytique des enzymes permet de produire de nouvelles substances et de l'énergie, indispensables au bon fonctionnement des organismes vivants. C'est en fonction de leur activité catalytique que celles-ci sont classées.

Une nomenclature a été proposée par la commission des enzymes de l'union internationale de biochimie divisant les enzymes en six grandes classes (Tab. 2) (Vincent, 1996).

**Tableau 2 :** Classification des enzymes (Vincent, 1996).

E.C (classe)	Classification	Type de réaction catalysée
E.C.1	Oxydoréductases	Oxydo-réduction
E.C.2	Transférases	Transfert de groupements fonctionnels
E.C.3	Hydrolases	Hydrolyse
E.C.4	Lyases	Elimination de groupement et formation de double liaisons
E.C.5	Isomérases	Isomérisation
E.C.6	Ligases	Formation de liaisons couplées à l'hydrolyse de l'ATP

#### 4. Marché des enzymes

Les enzymes industrielles conservent une forte croissance à l'échelle mondiale, plus de 1,5 milliards US\$ par an a été estimé sur le marché global. Parmi ces enzymes industrielles qui occupent la plus grande partie des ventes on trouve les protéases environ 60% en premier lieu. Ensuite, suivi par les alphas -amylases qui sont les plus commercialisées à cause de la diversité de leur applications en amidonnerie, glucoserie, brasserie (Pandey *et al.*, 2000).

#### 5. Présentation des amylases

##### 5.1. Définition

Les amylases sont des enzymes ubiquitaire, peuvent être synthétisées par tous les genres de microorganismes. Elle appartient à la famille des glycosides hydrolases regroupant plus de 1700 enzymes. Elles hydrolysent les liaisons osidiques de l'amylose, de l'amylopéctine, de l'amidon, du glycogène et d'autres polysaccharides contenant plus de trois des liaisons  $\alpha$  (1,4) D Glucose (Dauter *et al.*, 1999 ; Franco *et al.*, 2000).

##### 5.2. Caractéristiques et propriétés des amylases

Plusieurs équipes ont caractérisés et travaillés sur les propriétés physicochimiques des amylases (Panchal, 1990 ; Schombury et Salzmann, 1991). Parmi ces propriétés on a :

- **Poids moléculaire :** Le poids moléculaire des amylases varie selon l'origine des espèces. Exemple les alphas amylase leurs poids moléculaire est compris entre 40.000 et 90.000 daltons.
- **Température optimum :** Selon l'origine et les espèces, les alphas amylases ont des températures optimales comprises entre 40°C et 90°C.
- **pH optimum :** L'alpha -amylase est très sensible au pH. Par conséquent, le choix du pH optimum est très essentiel pour la production de cette enzyme. L'optimum d'activité peut être obtenu à des pH compris entre 4 et 8.
- **Effecteurs :** Toutes les L'alpha amylases, exigent la liaison à au moins un ion calcium, pour le maintien de leur intégrité et leur stabilité structurale, toutefois, à une concentration supérieure à 20mM, le calcium devient inhibiteur.
- **Spécificité du substrat :** Le substrat naturel de L'alpha -amylase est l'amidon dont les unités de glucose sont reliées par des liaisons osidiques  $\alpha$  (1- 4) en formant ainsi des chaînes hélicoïdales d'amylose.

### 5.3. Les différentes sources et origines de l'alpha-amylase

Les alpha-amylases sont abondantes dans tous les règnes, elles peuvent être extrait à partir des tissus végétaux, d'animaux ou par fermentation des cellules microbiennes (**Nadirman *et al.*, 2006**).

- **L'origine animale :** Les amylases d'origine animale sont généralement extraites à partir de la salive et du pancréas des mammifères. Ils sont incapables d'hydrolyser la liaison  $\alpha$  (1→ 6) de l'amylopectine ou du glycosyl oligosaccharides.
- **L'origine végétale :** Les L'alpha-amylases végétales présentent une importance dans le métabolisme glucidique. Elles sont impliquées dans la conversion de l'amidon en sucres réducteurs. Qui représentent une source nécessaire d'énergie à la germination.
- 

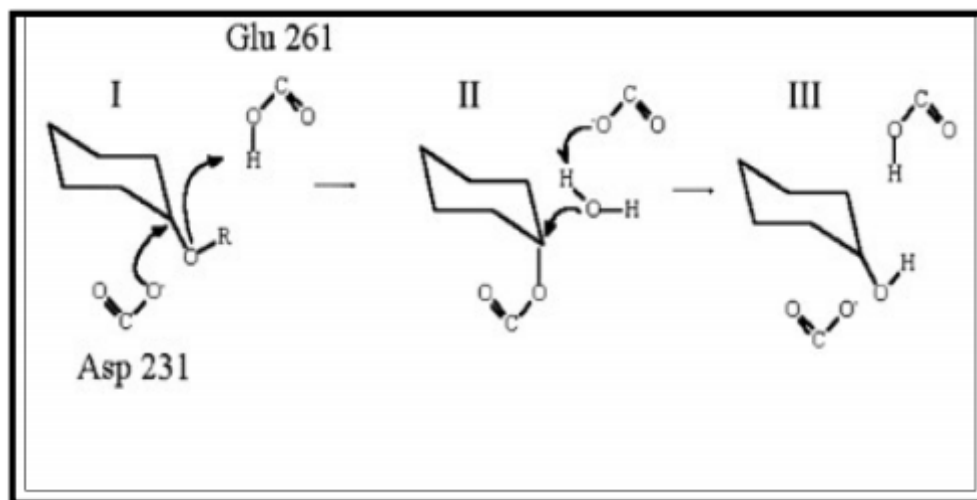
**L'alpha -amylase bactérienne :** De nombreuses amylases aux propriétés industrielles ont été découvertes chez des bactéries acidophiles, alcalinophiles et thermophiles. Ces enzymes interviennent dans la transformation de l'amidon par fragmentation r apide en

- clivant les liaisons  $\alpha$  (1→4). Ce type d'enzyme a été produit à partir de souches de *Bacillus*. Cependant, d'autres espèces, produisant également cette enzyme telle que *Streptomyces sp* ont été découvertes.

- **L'alpha -amylase fongique :** La production industrielle d'enzymes à partir des microorganismes fongiques existe depuis longtemps les principales sources fongiques sont les moisissures des genres *Aspergillus* et *Rhizopus*, en plus les moisissures, les levures participent également à la production de l'alpha- amylase.

#### 5.4. Mécanisme d'action

D'après **Davet *et al.*, 1996**. l'activité catalytique de l'enzyme implique la participation des trois acides aminés du site actif (ASP 231, Glu 261, et Asp 328. La réaction catalytique est réalisée en trois étapes (fig.7) (**Davet *et al.*, 1996; Nielson *et al.*, 2001**):



**Figure.7 :** Mécanisme catalytique des hydrolases glycosyliques (**Nielson *et al.*, 2001**).

- Protonation de l'oxygène glucosidique par le donneur de proton Glu 261 suivi d'une attaque nucléophile sur C1 du résidu du sucre en position 1 par ASP 231 et le départ de l'extrémité réductrice du substrat.
- Activation d'une molécule d'eau, vrai semblablement par le maintien du Glu 261 déprotonné.
- Régénération de l'état initial et libération de l'autre fragment du substrat, par hydrolyse du lien covalent entre l'oxygène nucléophile de l'ASP 231 et le C1 de résidu du sucre en position 1.

### 5.5. Applications industrielles

La commercialisation des alpha-amylases est la plus ancienne, ils sont parmi les hydrolases les plus importantes pour les industries amidonneries. La première utilisation en 1984 comme aide pharmaceutique pour le traitement de désordres digestifs (**Bennett, 1998**). Actuellement, les  $\alpha$ -amylases sont largement appliquées dans tous les processus industriels, et surtout avec les  $\alpha$ -amylases microbiennes. Ces derniers, ont bien remplacé, les catalyseurs chimiques dans les industries de transformation d'amidon, mais également dans les industries chimiques pharmaceutiques et autres.

**Tableau3:** Différentes applications des alpha-amylases

<b>Industries</b>	<b>Applications</b>
<b>Glucoserie</b>	Solubilisation de l'amidon ; accompagné d'une importante de la viscosité (liquéfaction). ( <b>Alais et al ., 2008</b> ).
<b>Sucrierie</b>	Réduction de la viscosité des sirops de canne a sucre, en hydrolysant les contaminants amylicé pour assuré le processus de cristallisation. ( <b>Van der et al ., 2002</b> ).
<b>Biscuiterie et panification</b>	Amélioration des propriétés, rhéologique et fermentaires de la pate ainsi que le volume de la mie et la coloration de la crouste. ( <b>pandey et al ., 2000</b> ).
<b>Industrie textile</b>	Désencollage textile ; qui permet d'éliminer la colle de l'amidon qui enduits les fibres et le protèges au cours du tissage. ( <b>Hendriken et al., 1999</b> ).
<b>Papeterie</b>	Liquéfaction de l'amidon pour préparer la sauce de couchage permettant d'éliminer les irréguliers superficiels de la feuille. ( <b>Tolan., 1996</b> ).
<b>détergeant</b>	Dégradation des taches a base d'amidon, les oligosaccharides et les dextrines libérés de l'action hydrolytiques sont soluble. Ce qu'il facilité le découpage physique de la tache. ( <b>Kotwitts et al., 1994</b> ).
<b>Industrie pharmaceutique</b>	Traitement de diabète et de l'obésité. ( <b>Nielson et al ., 2001</b> ).

# *Matériel et Méthodes*

## IV. Matériel et méthode

### 1. L'objectif global

L'objectif principal de ce travail est basé sur l'utilisation des actinobactéries isolé d'un sol de ferme de la région de Mostaganem. Le but de cette étude et de sélectionner souches performantes pour la production des amylases.

### 2. Protocol expérimental général

Le Protocol expérimental général est basé sur plusieurs étapes différents qui englobent des multiples objectifs tels que :

- A. Les sites de l'échantillonnage des sols ;
- B. L'isolement et la purification des bactéries actinomycètes ;
- C. Identification de la souche bactérienne par des tests physiologiques et biochimiques ;
- D. La fermentation sur le milieu solide des isolats d'actinomycètes dans un milieu nutritif à base d'amidon et l'extraction de l'extrait enzymatique.

### 3. Sites de prélèvement de l'échantillon

Le choix du site des prélèvements des échantillons a porté sur des sols de ferme de la région Hassi Mamèche de la wilaya de Mostaganem (fig. 8). Ce site est situé à 35° 51 37 Nord, 0° 04 23 Est. Il présente une superficie de 63 km<sup>2</sup>. Les prélèvements ont été effectués le 11 février 2019.



**Figure8** : site du prélèvement des échantillons région de Hassi Mameche.

A : Carte géographique du site ; B : la zone de prélèvement.

Deux échantillons sont prélevés aseptiquement à une profondeur d'environ 20cm (fig. 9). Les sols ont été placés dans des sacs stériles. Chaque échantillon est prélevé selon la méthode de cinq points aliquotes récupérer sur une surface de 100 m<sup>2</sup> (fig. 9).



**Figure9:** Les points des prélèvements des échantillons.

A . les quatre points de prélèvement ; B : l'estimation de fond et C : le profondeur d'une échantillon.(20cm).

#### 4. Isolement des actinomycètes

##### 4.1. Le milieu de culture

**kuster et williams, (1964)**, rapporte dans ses travaux, que les actinobactéries peuvent être isolés sur plusieurs milieux de culture liquide ou solides. Parmi ces milieux on a : milieu amidon caséines agar. La composition de cet milieu est présentée dans l'annexe I. Il doit être additionnée au moment d'emploi avec des antibiotiques soit des antifongique ou des antibactériens Gram- tels que : la cycloheximide (50µg /ml), nystatine 30µg/ml), streptomycine (10mg/l) et chloramphénicol (25 mg/l). Chaque antifongique se prépare dans un solvant approprié comme l'acétone pour la cycloheximine et l'eau distillée pour la nystatine etc. Le pH du milieu doit être ajusté à 7,2 et stérilisé (120°C/30 minutes).

##### 4.2. Préparation des dilutions

Les dilutions nécessite 1g d'échantillon de sol est dilué dans 10 ml d'eau distillée stérile puis agités au vortex deux fois pendant 5 minutes. A partir de cette suspension des séries de dilutions décimales de  $10^{-1}$  à  $10^{-5}$  sont effectuées. A l'aide d'une pipette de Pasteur stérile sous forme de râteau un volume de 1ml de chaque dilution ( $10^{-1}$  à  $10^{-5}$ ) a été étalée un milieu solide à base d'amidon et caséine , Annexe I). Trois répétions ont été réalisé pour chaque échantillon, les boites de pétrie ont été incubées à 30 C° pendant 7 à 14 jours (**Collins et al., 1995 ; Sudha et Haemalatha, 2015**).

#### 5. Purification et conservation des isolats

Les colonies d'actinobactéries sélectionnées sont prélevées délicatement à l'aide d'une anse de platine stérile puis purifiées par stries sur gélose nutritif (Annexe I) et incubés pendant une semaine à 30C°. Cette opération est répétée jusqu'à obtention des souches pures. Ces dernières

doivent être conservée à 4C° pour une réalisation ultérieure des tests biochimiques, physiologique et de la technique fermentation (**Shirling et Gottlieb, 1966**).

## **6. Identification morphologiques des actinobactéries**

### **6.1. Aspect macroscopique**

L'aspect macroscopique des souches a été examiné par une observation à la loupe binoculaire. L'étude des caractères morphologiques des actinomycètes filamenteux dépend des cultures jeunes présentant une bonne sporulation, la couleur la forme, l'aspect des colonies etc.

### **6.2. Aspect au microscope optique**

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 -).

**Coloration de Gram :** sur des lames en verre propres, des frottis des souches isolées ont été réalisés puis fixés par la chaleur en les passant, par mouvements rapides, trois quatre fois sur la flamme du bec bunsen. Les frottis préparés sont colorés avec une solution de violet de Gentiane, qui est un colorant basique, pendant une minute. Ensuite, les lames sont rincées par une solution iode-iodurée (Lugol) Afin que, ses dernières soient contrastées sans rincer et en inclinant les lames à 45°. Les frottis sont décolorés par lavage avec mélange d'éthanol. Cette dernière étape engendre l'aspect différentiel de la coloration de Gram. Les bactéries de coloration Gram positive gardent le violet de gentiane tandis que les autres le perdent et se décolorent. Finalement, les frottis seront recolorés au moyen d'un colorant basique de couleur rose (la fuchine) pendant une minute puis rincés abondamment à l'eau du robinet. Une fois séchées, les lames sont examinées sous microscope optique à l'aide de l'objectif (x100).

## **7. Identification physiologique**

### **7.1. Hydrolyse de l'amidon**

Ce test est réalisé en cultivant les souches sur milieu nutritif gélosé contenant 1% d'amidon soluble, selon la méthode de **Gordon et Smith 1953**. Après 7 ou 21 jours d'incubation à 30C°, la gélose est recouverte d'une solution de Lugol. L'hydrolyse est ainsi mise en évidence par l'absence de coloration autour des colonies. A l'inverse, les zones contenant de l'amidon restent en couleur.

### **7.2. Hydrolyse de la caséine**

L'hydrolyse de la caséine est étudiée selon la méthode de **Gordon et Smith (1953), et Williams et Gross (1971)**, sur un milieu gélosé contenant 5% de lait écrémé (Annexe I). Après 7 ou 21

jours d'incubation à 30°C, l'apparition de toute zone claire autour des colonies témoigne l'hydrolyse de la caséine.

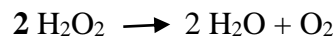
### **7.3. La dégradation l'urée**

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 37°C. L'observation d'une alcalinisation traduit une hydrolyse de l'urée et donc les souches 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. Identification biochimiques**

### **8.1. Test de catalase**

La catalase est une enzyme respiratoire capable de dégrader l'eau oxygénée (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) en eau et O<sub>2</sub> selon la réaction suivante :



Sur une lame et à l'aide d'une pipette pasteur, on dépose une colonie bactérienne à laquelle on ajoute de l'eau oxygénée H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (10%). La présence d'une catalase est révélée par l'apparition immédiate de bulle de gaz qui correspondent à l'oxygène dégagé (Tortora *et al.*, 2003).

### **8.2. La dégradation de la gélatine.**

La production de gélatinases par les bactéries a été étudié selon la méthode **Marchal et Bourdon (1 973)**. 4g de gélatine ajouté à 100 ml de gélose nutritive. L'ensemencement de la souche sur le milieu. Après avoir obtenue une bonne culture bactérienne (7 jours d'incubation à 37°C), la gélatine a été recouverte d'une solution de test gélatine qui contient le chlorure mercurique, HCl concentré et H<sub>2</sub>O, est ainsi mise en évidence par l'apparition d'une zone claire autour de la colonie (**De Vos *et al.*, 2009**).

### **8.3. Recherche de lécithinase**

Ce test a été réalisé par l'ensemencement des souches par une strie sur la gélose nutritive contenant l'émulsion du jaune d'oeuf stérile (**AnnexeI**). Après 7 jours d'incubation à 37°C, l'apparition de zone claire autour de la culture prouve que la souche possède la lécithinase (**De Vos *et al.*, .2009**).

### **8.4. La réduction de nitrate réductase**

Ce test a été réalise par l'ensemencement des souches est testée dans un bouillon nitraté et Incubé pendant 7 jours à 37°C, après l'incubation ajouter 1 à 2 gouttes des réactifs R1 et R2. Si

le milieu devient rouge : présence de nitrites, donc la souche NR positif. Si le milieu reste inchangé : ajouter la poudre de zinc qui joue le même rôle que la nitrate réductase, donc si la coloration est rouge le nitrates transformé en nitrites par le zinc (la souche NR négatif) pas de coloration, les nitrates ont été transformées par la souche (la souche NR+).

### **8.5. Les réactions VP et RM**

Sur un milieu liquide Clark et Lubs, une colonie de la souche à étudier est ensemencée puis incubé à 37°C pendant 7 jours. Après l'incubation, on divise le milieu dans deux tubes stériles et on ajoute 10 gouttes de VP I et 10 gouttes de VP II dans l'un des deux tubes. Ensuite, on ajoute 2 ou 3 gouttes de RM dans l'autre tube.

#### **-Pour la réaction de Voges Proskauer**

Si la coloration est rouge (la souche VP+)

Si la coloration est jaune (la souche VP-

#### **Pour le rouge de méthyle**

Si la coloration est rouge (la souche RM+)

Si la coloration est jaune (la souche RM-)

### **8.6. La production de H<sub>2</sub>S et fermentation le glucose et lactose**

Le milieu de Kligler-Hajna ou milieu lactose-glucose H<sub>2</sub>S est le plus couramment utilisé ce milieu est ensemencé avec la souche à étudier en effectuant des stries à la surface de la pente de la gélose, puis le culot est ensemencé par piqure centrale. Les germes acidifient le glucose en anaérobiose relative le culot vire au jaune. Si le germe n'utilise pas le lactose la pente devient rouge par réalcalinisation du milieu due à la formation de produits alcalins provenant de la dégradation des acides aminés. En cas où les germes utilisent le lactose (aérobiose) relative, il y a virage de la pente au jaune. Le milieu peut être coloré en noir de façon plus ou moins intense par production d' H<sub>2</sub>S. Le milieu peut être entièrement noir, la présence de gaz est détectée par la mise en évidence de bouilles ou le soulèvement de la gélose (**François et al., 2012**).

**8.7. L'utilisation de citrate** Inoculer en un seul strié sur la surface d'une pente de milieu de citrate de Simmons. Examiner chaque jour jusqu'aux 7 jours pour déterminer la croissance, le changement de la couleur confirmation des résultats positif (couleur bleue et strié de croissance), résultat négatif couleur de citrate verte d'origine. (**Samuel et al., 2003**).

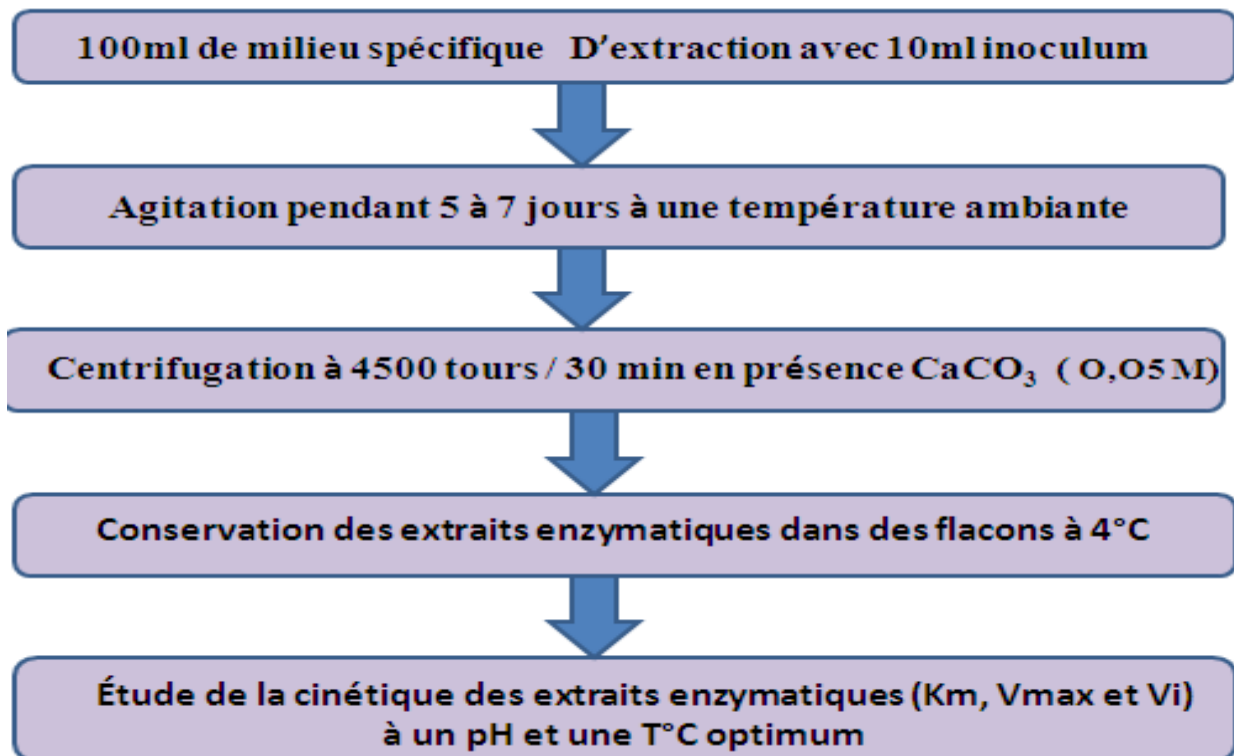
## 9. Fermentation et production des amylases

### 9.1. Préparation d'inoculum

Les souches d'actinobactéries déjà identifiées sont ensemencées en surface sur un milieu bouillons à base 5% d'amidon dans des flacons. Après 7 à 10 jours d'incubation à 30°C, les spores sont raclées par ajout de 10 ml de l'eau distillée stérile suivie d'une agitation vigoureuse. **Khawaja et al., 2011**). Le comptage des spores a été estimé par mesure de l'absorbance à 620 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV-visible. Des dilutions décimales sont effectuées en cas où l'inoculum est concentré, pour obtenir une suspension sporale de  $10^6$  spore /ml .

### 9.2. La fermentation submergée

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



**Figure10:** Protocole expérimental de l'extraction des extraits enzymatiques (**Oomah et al., 2011**).

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

L'extraction consiste à libérer les enzymes des cellules ou des constituants cellulaires. Elle nécessite un éclatement de la paroi ou de la membrane cellulaire, par des procédés physico- chimiques (**Laurent, 1982**). Une centrifugation a été effectuée pour séparer le mycélium et récupérer le filtrat. Ce dernier a été traité par bicarbonate de sodium 0,05M (VV) (fig.12). Ensuite, une deuxième centrifugation a été établie pour extraire la fraction enzymatique, le surnageant est récupéré puis conservé dans des flacons à 4° C, pour tester l'activité enzymatique des amylases (**Oomah et al., 2011**).

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

En milieu alcalin le cuivre divalent réagit avec les liaisons peptidiques des protéines pour former le complexe du biuret, de coloration violacée caractéristique (**Doumas et al., 1981**). Les acides aminés isolés et les dipeptides ne forment pas de composé coloré en présence de cuivre (CuSO<sub>4</sub>), deux liaisons peptidiques adjacentes sont nécessaires. Il apparaît une coloration violet-rose devenant de plus en plus bleue. 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 : 0,5 ; 1 ; 1,5 ; 2 ; 2,5 ; 3ml compléter à 4 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.

**9.5. Étude cinétique des extraits enzymatiques****9.5.1. Préparation de la gamme d'étalonnage du glucose**

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

**Mode opératoire**

La préparation des différentes dilutions (0,5 ; 1 ; 1,5 ; 2 ; 2,5 ; 3ml) 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 5 ml du réactif Fehling.
- Chauffer les tubes pendant 10 minutes dans un Bain-marie à 37°C ;
- Ajouter 3 ml d'eau distillé dans les tubes laisser refroidir pendant 3 minutes environ ;
- Mesurer l'absorbance DO à 540 nm en utilisant un spectrophotomètre UV-visible ;
- Tracer la courbe de la densité optique en fonction de la de glucose oxydé en  $\mu\text{mol}$  [DO = f (C )].

### 9.5.2. La cinétique des extraits enzymatiques

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

- **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  $\lambda = 540$  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.

La détermination des paramètres cinétiques des extraits enzymatiques d'amylase dans un tampon acétate pH 5,2 est mise en évidence par la courbe de la gamme des dilutions du glucose en présence du réactif de Fehling (**Annexe I**). 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.

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

**$V_i$**  : 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) ( $\text{mol.l}^{-1}$ );

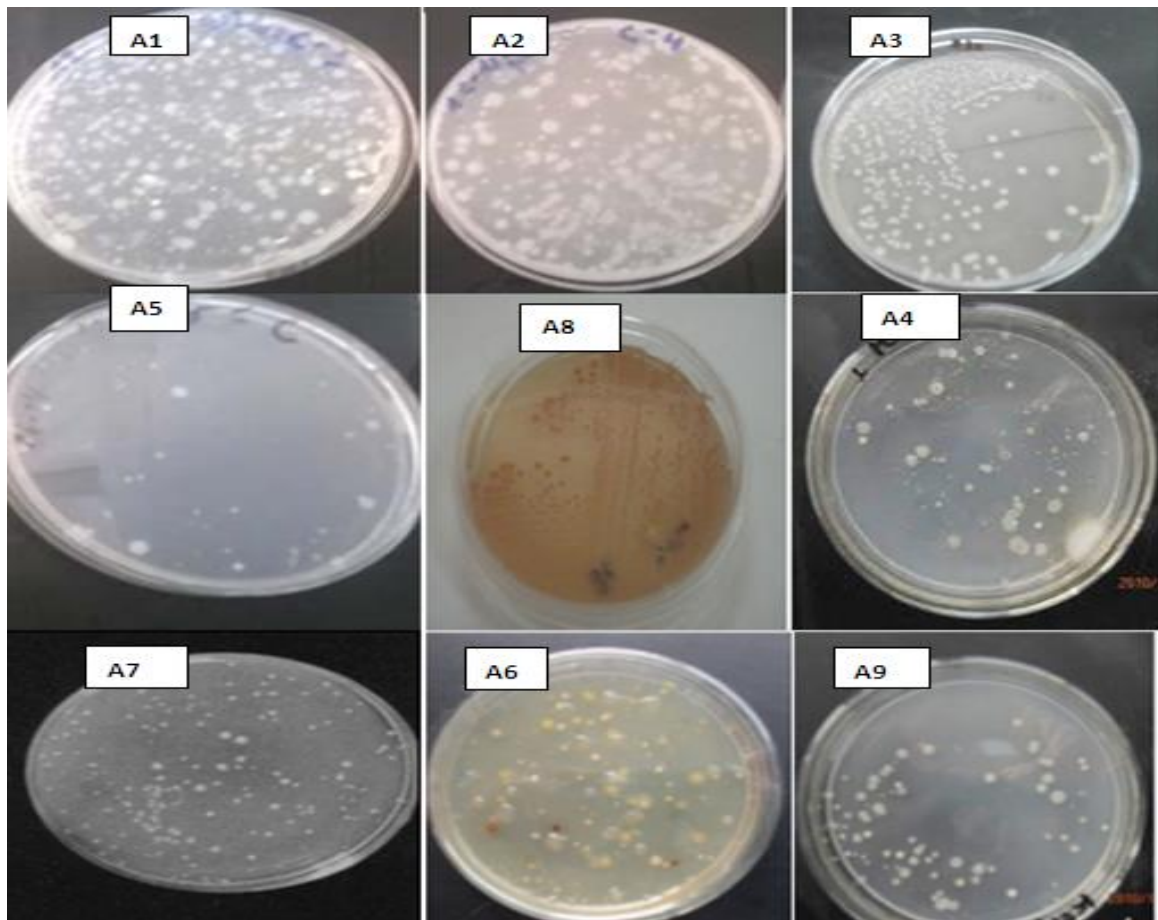
**$K_m$**  : Constante de Michaelis ( $\text{mol.l}^{-1}$ ); elle correspond à la valeur de [S] pour laquelle  $V_i = V_{max}/2$ .

## *Chapitre IIV*

# **Résultats et discussion**

**IIV. Résultats et discussion****1. Purification des actinomycètes**

Après 8 jours d'incubation sur milieu l'amidon caséine agar, les colonies d'actinomycètes ont été reconnues par leurs aspects morphologique macro et microscopiques caractéristiques. On a constaté que les échantillons de sol sont riches et diversifiés en actinobactéries (fig. 11). Cela a permis de sélectionner plusieurs isolats susceptibles d'être ultérieurement sélectionnées pour leurs aptitudes amylotiques.



**Figure 11:** Observations macroscopiques des colonies d'actinobactéries.

Les résultats montrent après l'isolement qu'il existe une multitude souches des actinomycètes isolés du sol de la région de Hassi Mamech (Mostaganem). Les colonies obtenues sont des tailles différentes petite, moyenne et grande dont leurs diamètres varient de 2 à 5 mm.

La forme est variable bombé, ronde, aplatie etc. possédant un mycélium végétatif surmonté d'un mycélium aérien de couleurs différentes jaune, blanche, beige etc.

D'après, **Balasubramaniam et al. (2011)**, les couleurs du mycélium aérien ne sont pas les mêmes que celui de substrat. La plupart ont une couleur blanchâtre et des autres des couleurs différentes telles que le gris, beige, noir, marron. Ces résultats confirment les résultats constatés.

La seconde étape était la purification de onze isolats sur le milieu nutritif gélose, afin, de vérifier leurs puretés. Les souches pures d'actinomycètes présélectionnés pour les tests biochimiques et physiologiques sont présentées dans la (fig.12) ci-dessous ou les mêmes résultats sont relevées pour les colonies des différentes souches, concernant la taille, la forme et la couleur etc.



**Figure12** : Purification des isolats des actinomycètes sur milieu caséine amidon.

Les actinomycètes sont des bactéries filamenteuses, elles constituent le groupe bactérien le plus variable et le plus importants de point de vue écologique et biotechnologique. Lorsqu'ils

évoluent sur un substrat solide, comme la gélose, ils se développent sur la surface et à l'intérieur du milieu de culture (Prescott, 2010). Ce qui explique leurs dénominations en grec « Champignons à rayons » ou « champignons rayonnants » (Gottlieb, 1973).

**2. Caractérisations morphologiques de la souche actinomycète**

La caractérisation morphologique des souches des actinomycètes est basée sur les l'aspect macroscopique observés à l'œil nu et à la loupe binoculaire, ainsi que l'aspect microscopique des isolats de sols (tab. 4).

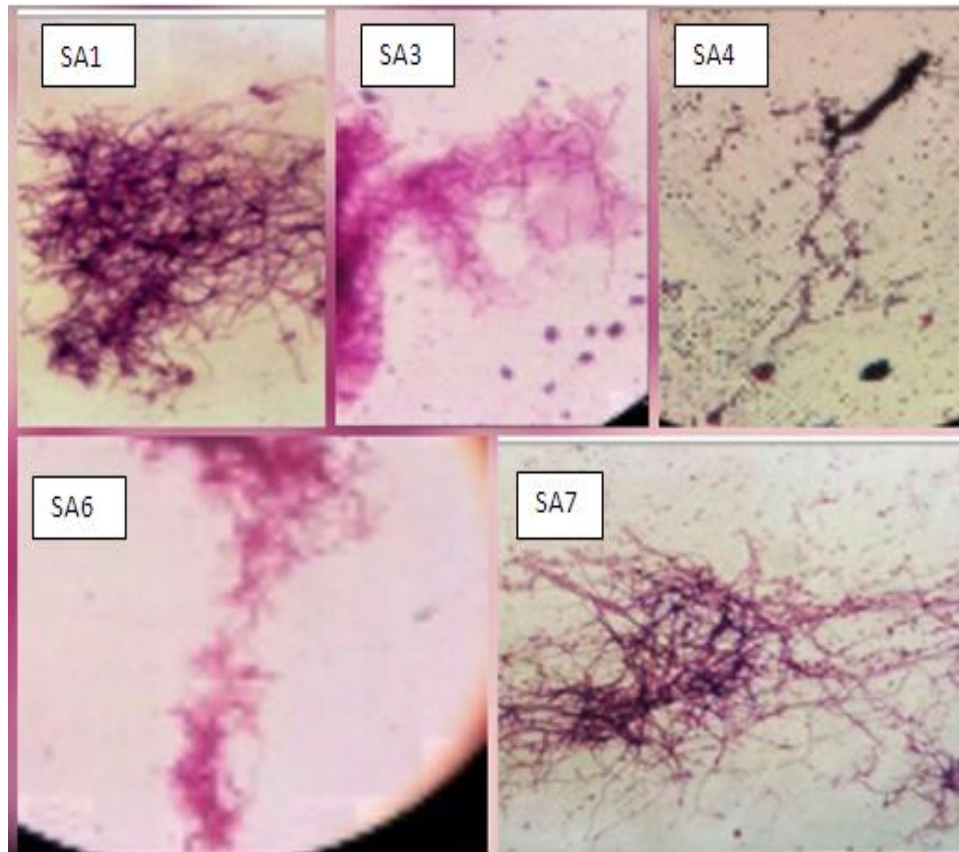
**Tableau 4 :** caractérisation macroscopique et microscopique des souches d'actinomycète.

Souches	Taille			forme	couleur	Mycélium Végétatif	Mycélium aérien	
	petite	moyenne	grande				Hyphe	Spore
SA1	X			Ronde Bombé	Blanche	Beige	Blanche	exogène
SA3		X		Bombé	Beige	Blanche	Blanche	exogène
SA4		X		Bombé sec	Blanche	Beige	Blanche	exogène
SA6	X			Ronde Sec	Jaune	beige	Blanche	exogène
SA7		X		Aplatie	Blanche	Blanche	blanche	exogène

**2.1. Coloration de Gram**

Les résultats des colorations reflètent la composition chimique de la paroi des bactéries d'une manière généralement particulièrement celle des actinomycètes. Afin, de distinguer la classification des souches d'actinomycètes isolés. Après observation des frottis colorés au microscope optique à l'objectif fort (G 100x).

Il s'est avéré que les cinq souches actinomycètes isolées sont des bactéries filamenteuses, à coloration de Gram positive. D'après Aouiche *et al.* (2012), Rosilma *et al.* (2016), ont confirmé que tous les actinobactéries sont de Gram positive (fig. 13).



**Figure13** : Coloration de Gram des cinq souches d'actinomycete isolé.

Le mycélium végétatif apparait sous forme d'un réseau très ramifié d'hyphes longue et enchevêtrés non fragmentés ni sporulés sur le milieu utilisé. Il supporte un mycélium secondaire abondant et bien sporulé. Les chaînes de spores immobiles en forme spiralées qui se fragmentent en spores sphériques dont le nombre qui varie d'un même milieu de culture un peut atteindre 40 spores par chaîne .(zidane et Maddi,2017).

### 3. Tests physiologiques et biochimiques

Les résultats des différents tests physiologiques et biochimiques des 5 souches d'actinomycètes sélectionnées sont présentés dans le **Tab.5** Une série de tests physiologiques utilisés par les taxonomistes pour la différenciation entre les espèces et groupes des actinomycètes sont retenues pour l'identification des souches isolées. Les résultats de ses différents tests sont cités et discutés ci-après.

**Tableau 5** : Tests physiologiques et biochimiques des isolats d'actinomycètes.

LES SOUCHES							
Caractéristiques		TM	SA1	SA3	SA4	SA6	SA7
Hydrolyse de la caséine		-	+	+	+	+	+
Hydrolyse de l'amidon		-	+	+	+	+	+
Hydrolyse de la gélatine		-	+	+	+	+	+
Réduction des nitrates		-	+	+	+	+	+
Lécithinase		-	+	+	+	+	+
Les fermentations intermédiaires	VP	-	-	-	-	-	-
	RM	-	+/-	+/-	+/-	+/-	+
Recherche de Catalase		-	+	+	+	+	-
Dégradation de l'urée indole		-	+	-	+	-	-
L'utilisation de citrate		-	-	-	-	-	-
TSI	glucose	-	Anaérobie Facultatif -	Anaérobie Facultatif -	Anaérobie Facultatif + / -	Anaérobie Facultatif -	Anaérobie Facultatif -
	Lactose	-	Aérobie Facultatif -	Aérobie strict +	Aérobie strict +	Aérobie Facultatif +/-	Aérobie strict +
	H <sub>2</sub> S	-	-	-	-	-	-

### 3.1. Hydrolyse de la caséine

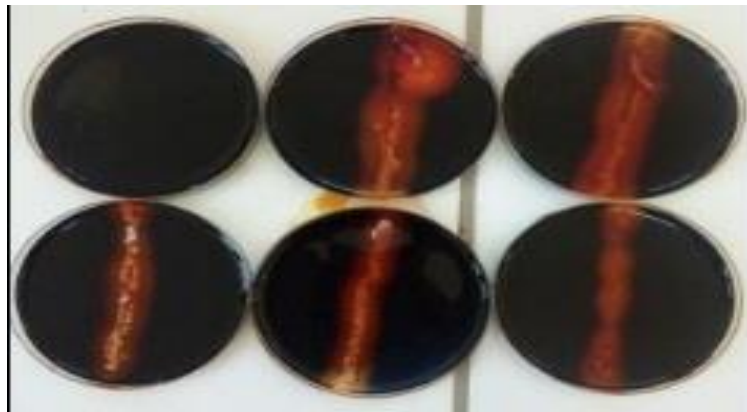
La présence d'halo d'éclaircissement autour de la culture signifie que les résultats sont positifs pour toutes les souches isolées d'actinomycètes (tab. 5 et fig. 14). Cette dégradation de caséine est due à la présence de caséinase.

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

Dans certains travaux réalisés sur les tests physiologiques d'actinobactéries isolés des sols confirment que la plupart des souches d'actinomycète peuvent hydrolyser les caséines du lait; **Palaniyandi *et al.*, 2013 et Benzekhroufa2018.**

### 3.2. Hydrolyse d'amidon

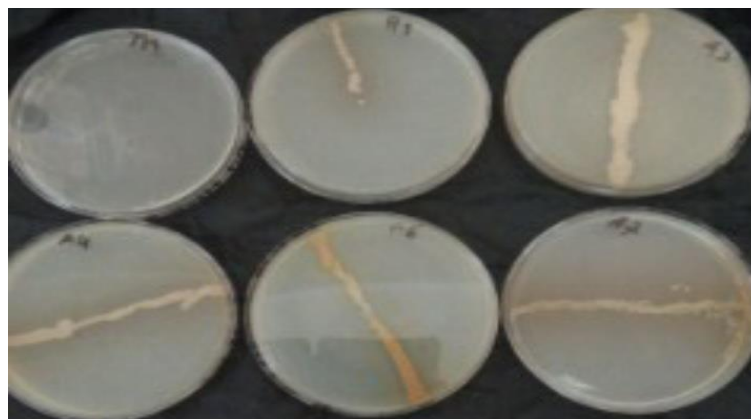
Toutes les cinq souches dégradent l'amidon, cette dégradation est révélée par la présence de coloration autour des colonies. Nous avons observé que les cinq souches, et dégradent l'amidon, et cela est due à la présence alfa Amylase chez l'actinomycète sellons (**Demain et Solomon, 1985 ; Sanglier *et al.* 1993).**



**Figure 15 :** Hydrolyse d'amidon.

### 3.3. Hydrolyse de gélatine

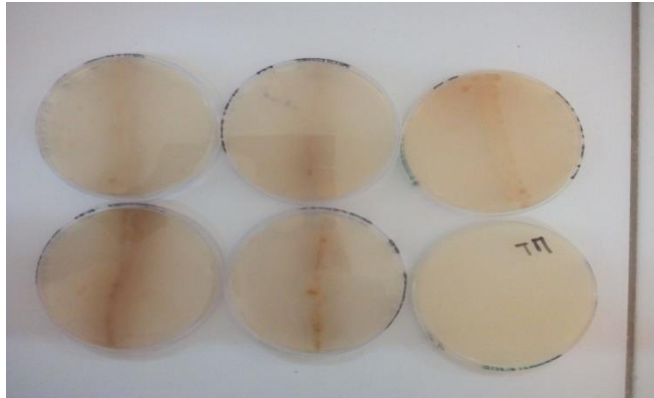
Les cinq souches d'actinomycètes isolés sont des déprédatrices de la gélatine. Les tests sont positifs on a noté présence des zones claires correspondant aux zones d'hydrolyse de la gélatine. Selon le **BergeyManuel (2012), Boughachiche (2012), et Mohamed Harir (2017),** cette dégradation est due à la présence de l'enzyme gélatinase chez les actinomycètes,



**Figure 16:** Hydrolyse de gélatine.

### 3.4. Recherche de lécithinases

La figure ci-dessous (fig. 17) présente les résultats des tests de lécithinases, les cinq souches possèdent l'enzyme lécithinase.



**Figure 17 :** Test positif d'hydrolyse de la lécithine en présence des *souches d'actinomycètes*.

La lécithinase permis de dégrader la lécithine. Les cinq souches présentent des résultats positifs. Une présence des zones de protéolyses transparentes traduites l'hydrolyse de la lécithine. Ces résultats sont similaires aux travaux de **Das *et al.* (2012)**, et **Cheriet et Amari (2016)**.

### 3.5. Réduction des nitrates

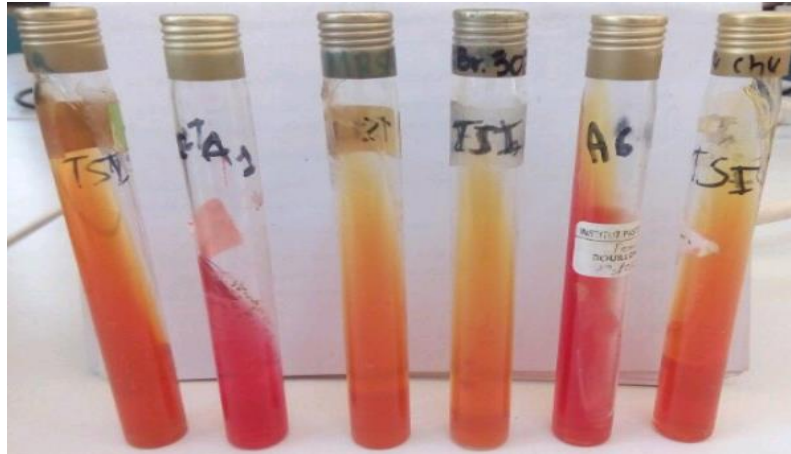
Le résultat montre que le testes des nitrates est positif en présences des souches cinq de actinomycètes (**fig. 18**). La couleur du milieu n'a pas changée en présences des réactifs NR1 et NR 2 et même lorsque on ajouté la poudre de zinc. Cela permet de dire que les nitrates du milieu sont transformés en nitrites, ce qui explique que les souches d'actinomycètes possèdent l'enzyme nitrate réductase très active. Des résultats positifs ont été déjà obtenus par **Boughachiche (2016)**, **Benzekhroufa2018**.



**Figure 18 :** Tests de réduction des nitrites positif en présence les cinq souches.

### 3.6. Production de sulfure d'hydrogène (H<sub>2</sub>S) et fermentation des sucres.

Après l'incubation des souches pendant 8 jours sur le milieu TSI, on a enregistré absence d'une coloration noire dans le milieu. Cela signifie que les cinq souches ne sont pas productrices de l'H<sub>2</sub>S, (fig. 19).



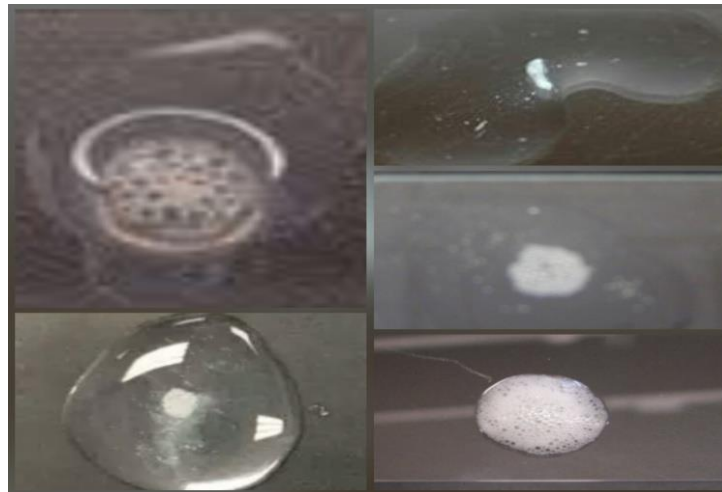
**Figure 19** : Les résultats des tests TSI des cinq isolats.

Les milieux des souches A1, A3, A6, A7 restent inchangé au niveau de culot (pas coloration jaune) signifie que les quatre souches n'ont pas utilisée le glucose. Par contre, dans le milieu de la souche A4, il ya un changement eu niveau du culot (coloration jaune) signifie que le résultat et positif, la souche a fermentée le glucose.

Les souches A3, A4, A6, A7, il y a un changement de milieu au niveaux de la pente (coloration jaune), qui signifie que les quatre souches ont utilisées le lactose, donc le résultat est positif. .Contrairement, la souche A1 aucun changement n'a été observé (pas de coloration jaune) donc le résultat est négatif. Le même résultat positif a été obtenu par **Abbes et Bouteraa (2017)**.

### 3.7. Recherche de catalase

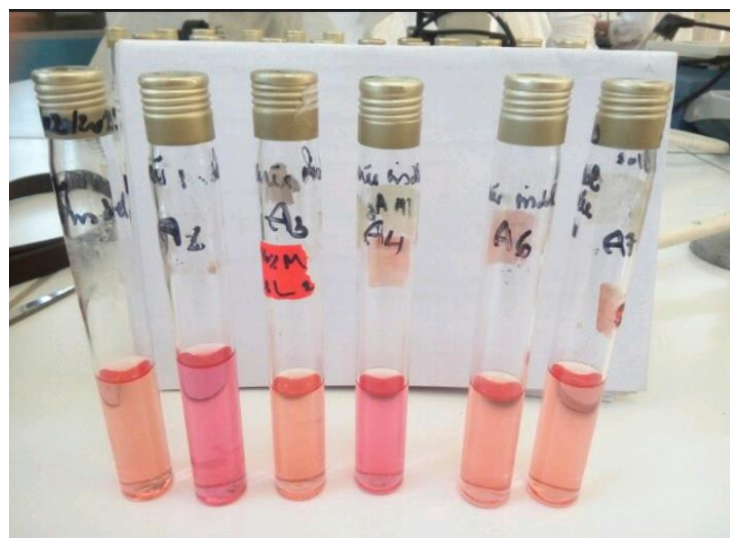
L'examen de la recherche de la catalase, montre que les trois souches A1, A3, A4, sont catalase positive (apparition de bulles d'air), car le catalase c'est une oxydoréductase hémnique qui catalysera dismutation du peroxyde d'hydrogène eau et dioxygène. Pour les deux souches A6, A7 ne produits pas de catalase (absence de bulle d'air) (fig. 20). Les mêmes résultats sont obtenus par les chercheur **Vengadesh et al. (2011)**, **Sarkonen et al. (2001)**



**Figure 20** : Résultats de teste catalase des cinq isolats.

### 3.8. Dégradation l'urée

La couleur du milieu teinte rouge qui indique la dégradation de l'urée cela signifie que les A1 et A4 présente un teste positif ce qui veut dire que les deux souches synthétisent l'enzyme uréase représentable (fig .21). Par contre, les souches A3, A6 et A7 le milieu reste inchangé qui indique l'absence de la dégradation de l'urée. Cela signifie que les trois souches présente un teste négative.

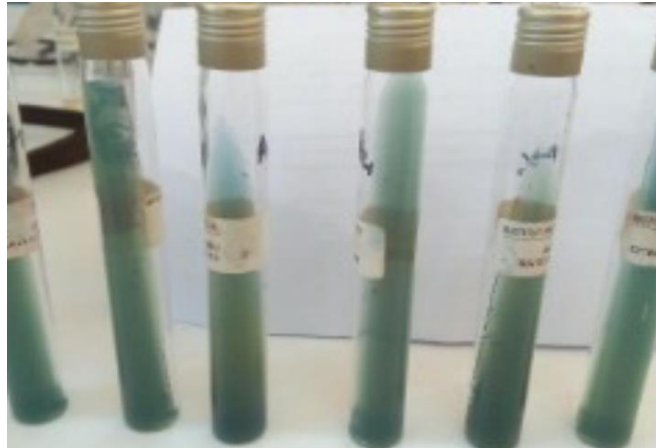


**Figure 21:** Tests de dégradation de l'urée

Les résultats positifs (A1 et A4) sont obtenus trouvés par **Cheriet et al., (2015)** **Boughachiche (2012)**, et le résultat négatif (A3, A6 et A7) obtenu est identique au résultat trouvé par **Belyagoubi (2014)**.

### 3.9. L'utilisation de citrates

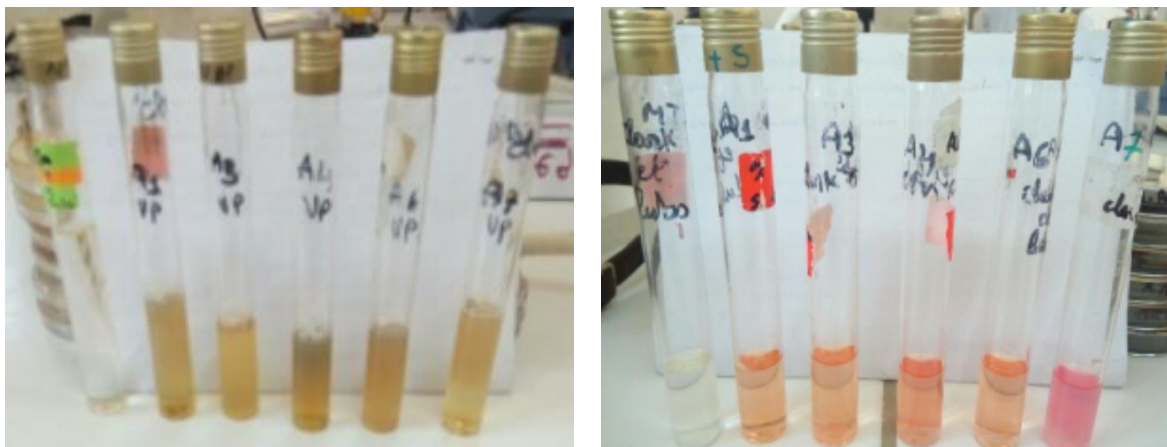
Les résultats obtenus avec les différentes souches de l'Actinomycètes sont négatifs, Les souches n'ont pas utilisé le citrate du milieu comme source de carbone (**fig. 22**). La couleur des milieux restent vert, et n'a pas virée le bleu, les mêmes résultats sont publiés par **Abbes et Bouteraa (2016)** et **Harir et al. (2017)**.**Bessaad et Sadaoui(2017)**.



**Figure 22 :** Tests négatifs d'utilisation de citrate en présence des souches d'actinomycètes.

### 3.10. La réaction de VP et RM

Les tests de VP sont négatifs aucun changement de couleur des milieux n'est enregistré. Par contre, les RM sont positifs, la couleur à virer vers le rouge ou rose foncé (**fig. 23**).



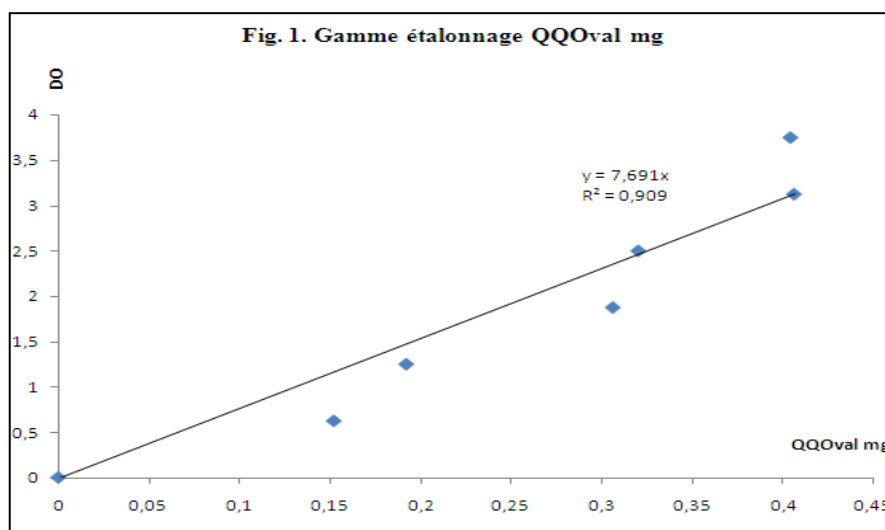
**Figure 23 :** Tests négatifs de VP et positifs de RM avec les souches d'Actinomycètes.

Les souches d'actinomycètes (A1, A3, A4, A6, A7) assurent les réactions des acides mixtes en présence du réactif RM. Les mêmes résultats ont été obtenus par **Gouse Basha Sheik et al. (2017)**, et **Maouche et Merabet (2018)**.

#### 4. Production des extraits enzymatique des isolats des actinomycètes

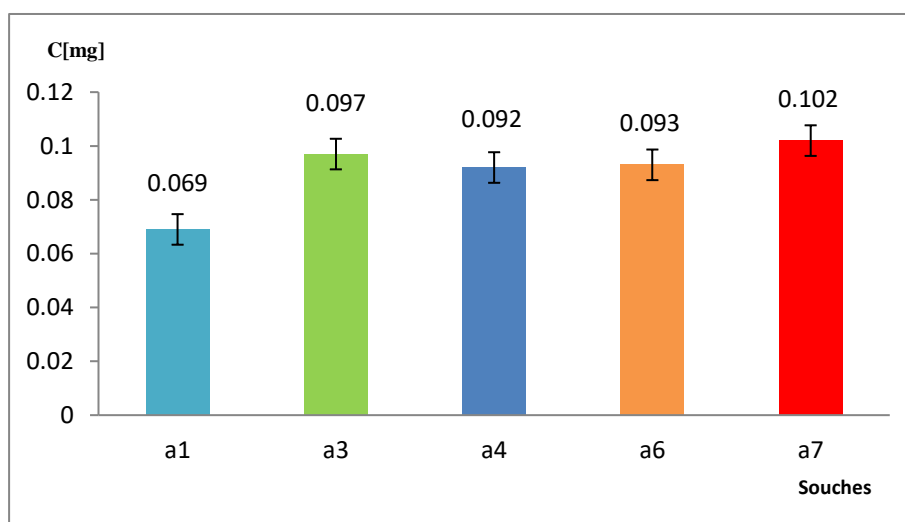
##### 4.1. Dosage des extraits enzymatiques par la réaction de Biuret

La méthode colorimétrique de Biuret a été effectuée pour le dosage des extraits protéiques des enzymes solubles dans le milieu liquide d'extraction des isolats des actinomycètes. Cette quantification est réalisée grâce au dosage des différentes dilutions de la protéine ovale albumine dans les mêmes conditions opératoires (pH= 5) (Fig. 24).



**Figure 25 :** Courbe de la gamme d'étalonnage de la protéine ovalalbumine.

La figure ci-dessous représente la gamme d'étalonnage d'ovale albumine et les concentrations des extraits enzymatiques des cinq isolats de *Streptomyces* sp.

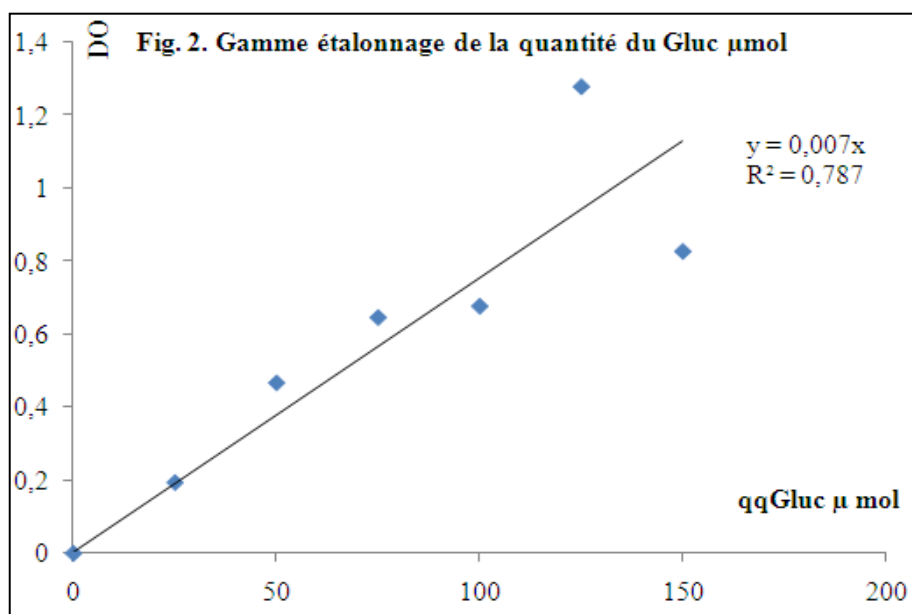


**Figure 26:** Concentrations des extraits protéiques des trois isolats *Streptomyces* sp.

Les résultats obtenus sur les concentrations des extraits protéiques confirment les résultats des tests d'hydrolyses d'amidon. L'isolat de *Streptomyces* sp A7 renferme une concentration protéique supérieure aux autres isolats A1 ,A3 ,A4 et A6 avec des valeurs respectivement de 0.069 ,0.097,0.092,0.093 et 0.102(fig. 26). Les résultats obtenus sont cohérents avec ceux qui ont été obtenus par les tests des paramètres cinétiques Km, Vmax et Vi qui seront abordés et discuté ci-dessous.

#### 4.2. Cinétique des extraits d'amylasiques des isolats des *Actinomycètes*

Les extrait enzymatiques des amylases obtenus à partir des isolats de **des *Actinomycètes*** sont utilisés bruts, et dilués pour l'étude de la cinétique d'hydrolyse de glucose. Cette cinétique est estimée par la technique colorimétrique de la réduction du réactif de 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. 27).



**Figure 27** : 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  $R^2 = 0,79$  proche de la valeur 1. Cela signifie que cette gamme d'étalonnage des différentes dilutions est en linéarité et elle peut être utilisée pour doser le sucre réducteur (Produit). Cette courbe va servir à estimer les quantités du produit libéré, après l'hydrolyse du substrat l'amidon. En premier lieu, on a tracé les courbes des différentes activités amyliques constatées des extraits enzymatiques en fonction du temps des cinq souches (fig. 28 ; 29,30 ,31 et 32).

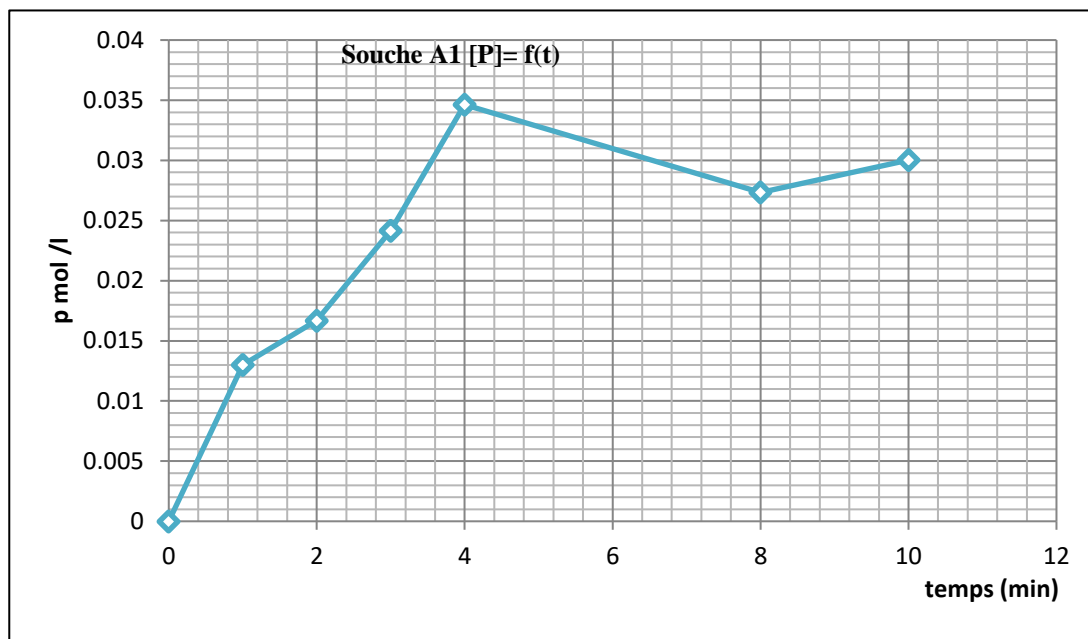


Figure 28: Cinétique du produit libéré par l'action de l'extrait d'amylase de la souche A1.

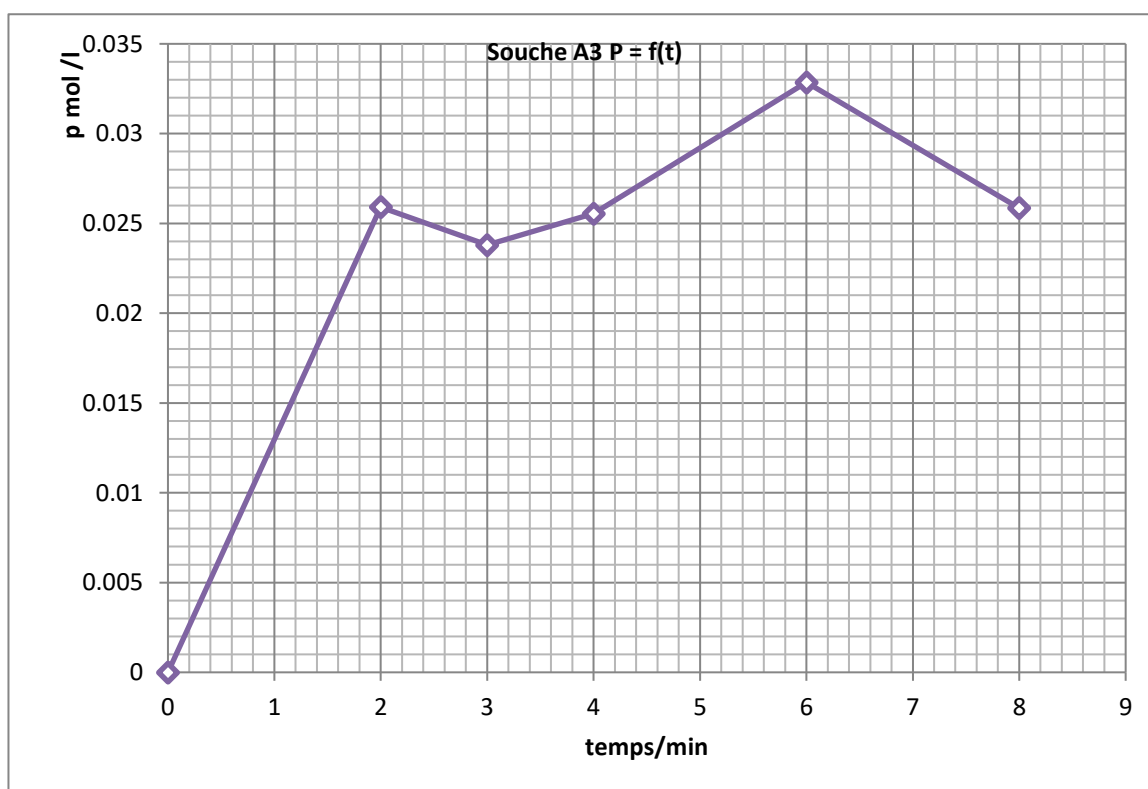


Figure 29: Cinétique du produit libéré par l'action de l'extrait d'amylase de la souche A3.



Figure 30: Cinétique du produit libéré par l'action de l'extrait d'amylase de la souche A4.

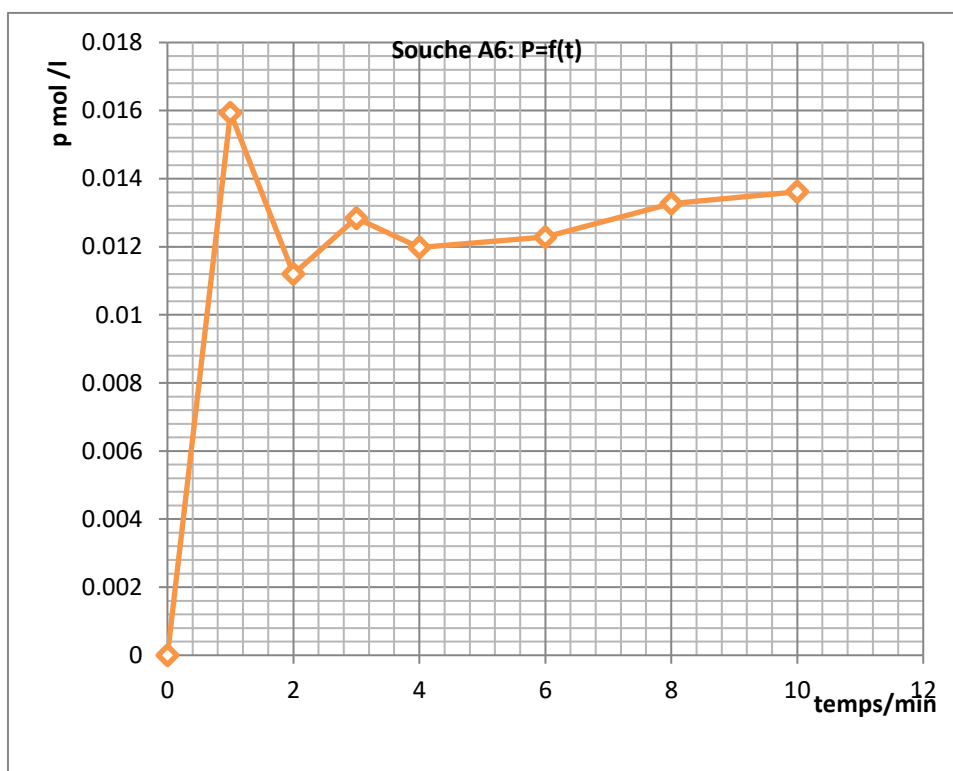


Figure 31 : Cinétique du produit libéré par l'action de l'extrait d'amylase de la souche A6.

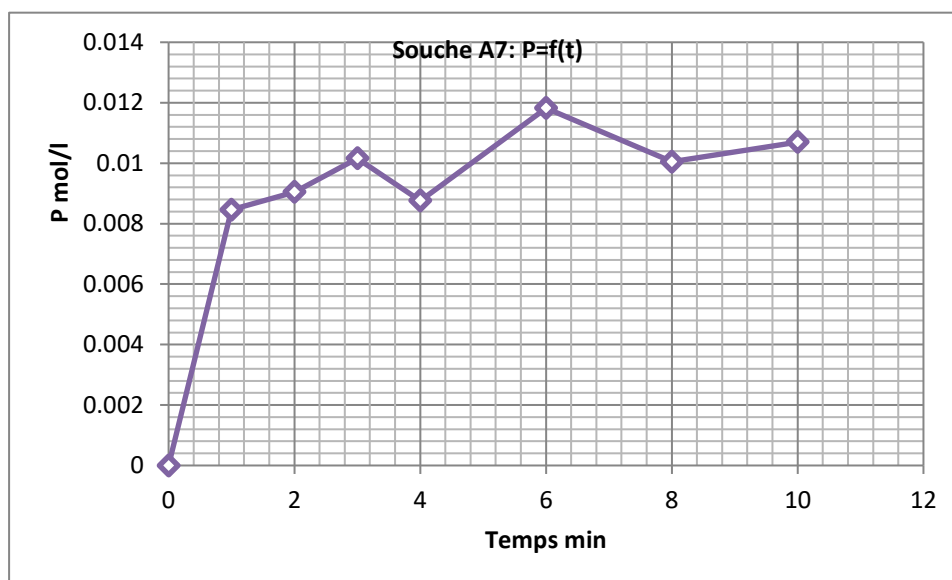


Figure 32 Cinétique du produit libéré par l'action de l'extrait d'amylase de la souche A7.

Le dosage des produits libérés au cours des différentes réactions présentent des valeurs supérieures de 0.102, 0.097, 0.093, 0.092 et 0.069 de glucose respectivement pour les isolats A7, A3, A6, A4 et A1. Toutefois, le temps de transformation du substrat (amidon) en produits varie de 1 minute à 6 minutes. La souche A6 est plus rapide dans l'hydrolyse de l'amidon en glucose par rapport aux autres souches (A1, A3, A4 et A7), les valeurs des différents temps de l'hydrolyse sont de 1, 4, 6 minutes respectivement pour les isolats A6, A1 et A4, A3 et A7 (fig. 28, 29 et 30, 31 et 32).

En effet, dans les essais à blanc (témoins) réalisés en absence des extraits d'amylase, les substrats (amidon) n'ont pas été hydrolysés, le réactif de Fehling garde sa couleur. Cette méthode confirme que les extraits enzymatiques sont riches en amylases. Selon **Ragunatha et Padhmadas, (2013)**, les *Streptomyces* sont la source la plus commune de cette enzyme.

#### 4.3. Mesure des paramètres cinétiques

D'après la figure ci-dessus, les extraits enzymatiques hydrolysent le substrat d'amidon progressivement en fonction du temps. On a remarqué que les extraits des souches A3, A4, A6 et A7 présentent des DO élevées qui expriment des fortes teneurs en produits libéré par rapport à celle de l'extrait de la souche A1 (fig. 27).

Théoriquement, la densité est proportionnellement à la concentration du produit de l'hydrolyse d'amidon, qui est le glucose. Grâce à la courbe de la gamme d'étalonnage du glucose, ces courbes cinétiques des quantités des produits sont déterminées. Cependant, la

quantification des produits permet de déterminer les vitesses des réactions et tracer les courbes  $V_i = f([S])$ , afin de calculer les paramètres cinétiques (tab. 6). Les courbes des cinétiques enzymatiques des extraits d'amylases des cinq souches en fonction du temps permettent aussi de caractériser les activités enzymatiques par les constantes cinétiques (tab. 6). L'équation de Michaelis-Menten a été utilisée pour évaluer les constantes cinétiques des différentes préparations enzymatiques.

Les courbes des figures de 33 à 37 représentent respectivement les cinétiques enzymatiques des différents extraits amyliques des souches A1, A3, A4, A6 et A7.

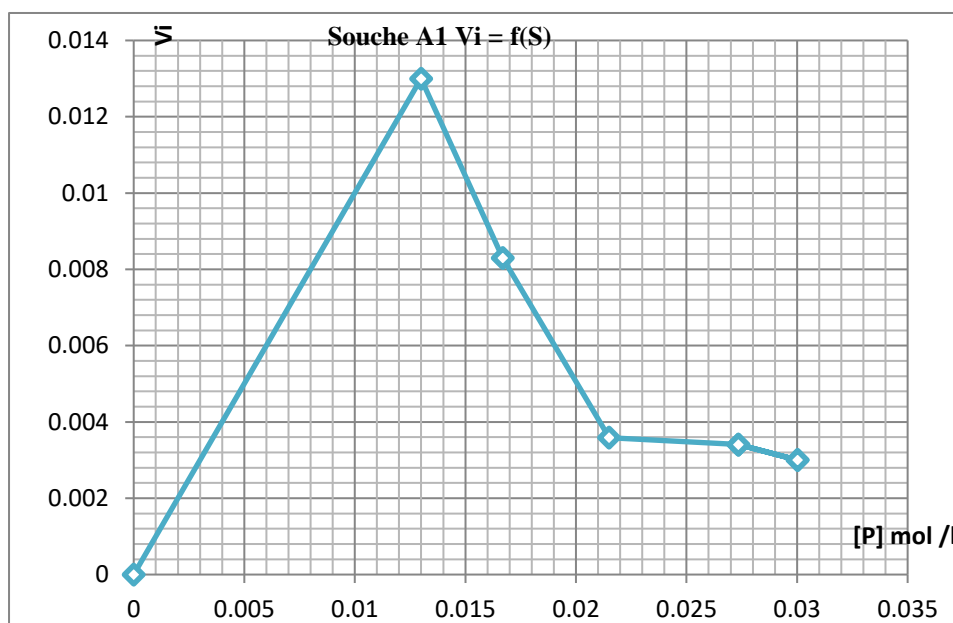


Figure 33 : Cinétique enzymatique de l'extrait d'amylase de la souche A1.

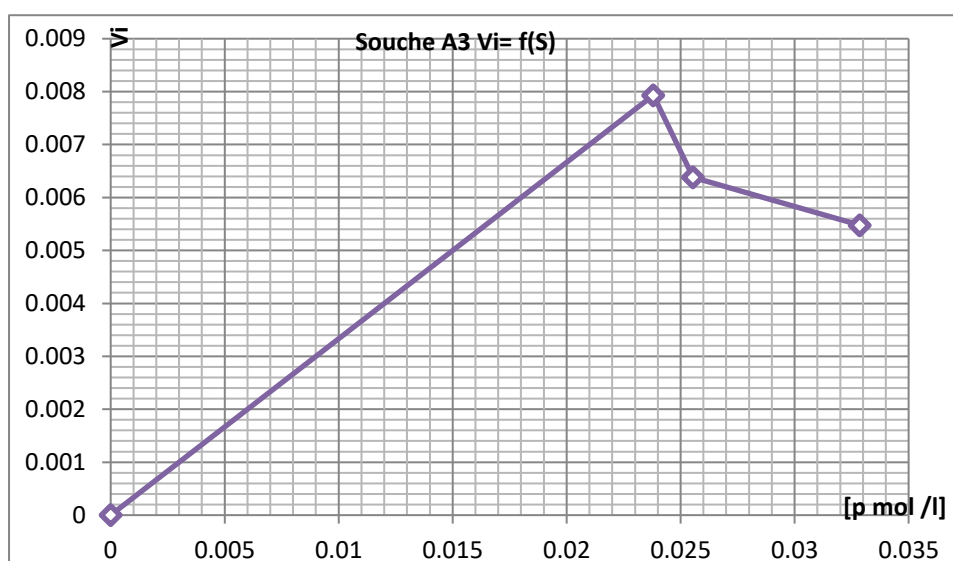


Figure 34 : Cinétique enzymatique de l'extrait d'amylase de la souche A3.

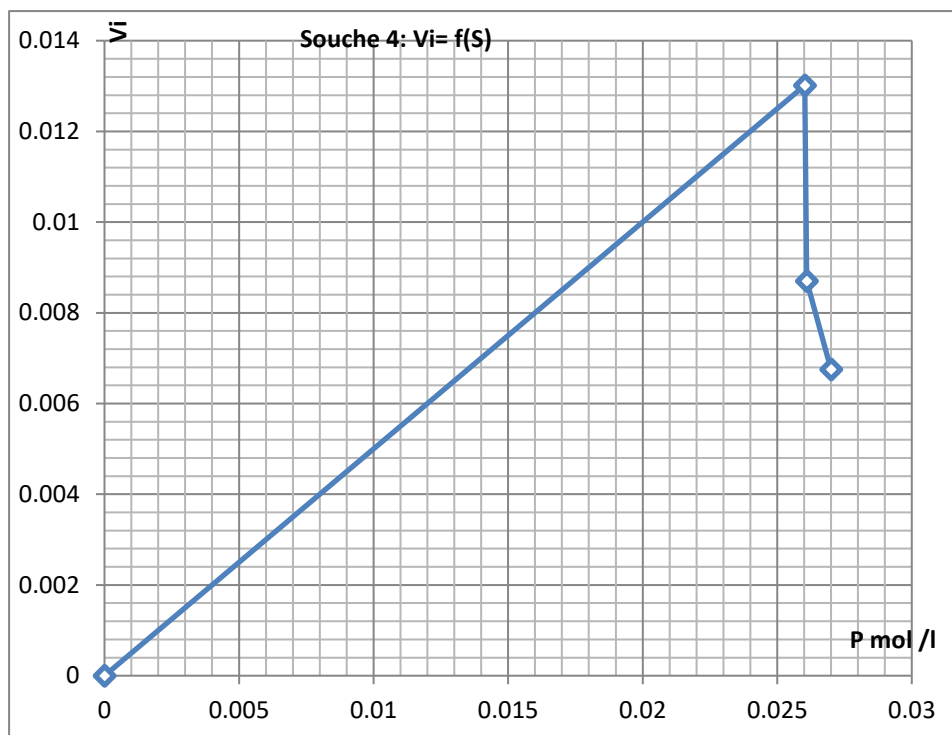


Figure 35 : Cinétique enzymatique de l'extrait d'amylase de la souche A4.

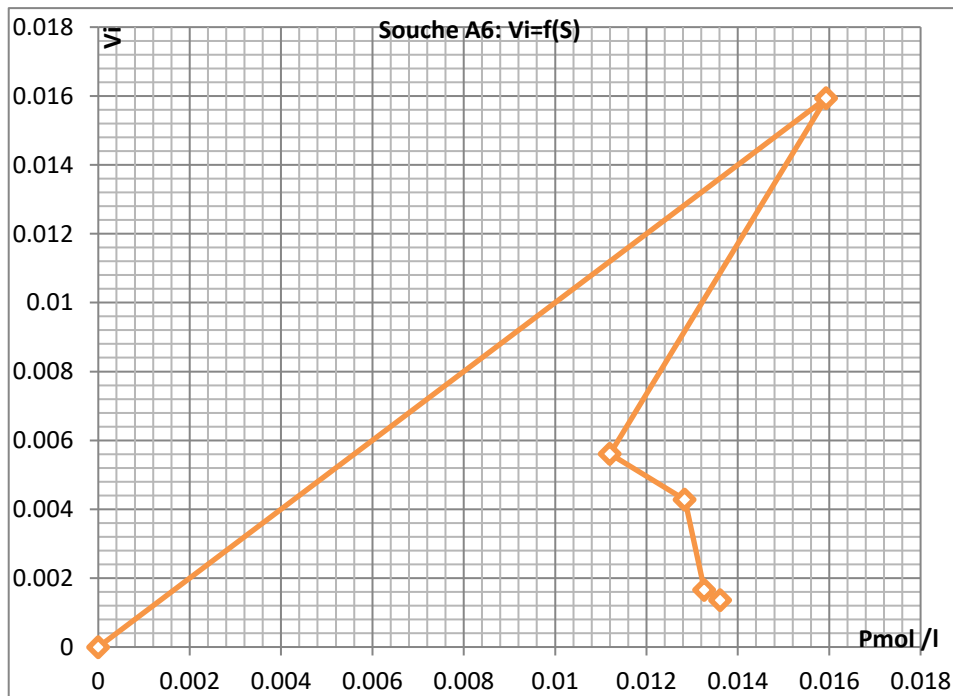


Figure 36 : Cinétique enzymatique de l'extrait d'amylase de la souche A6.

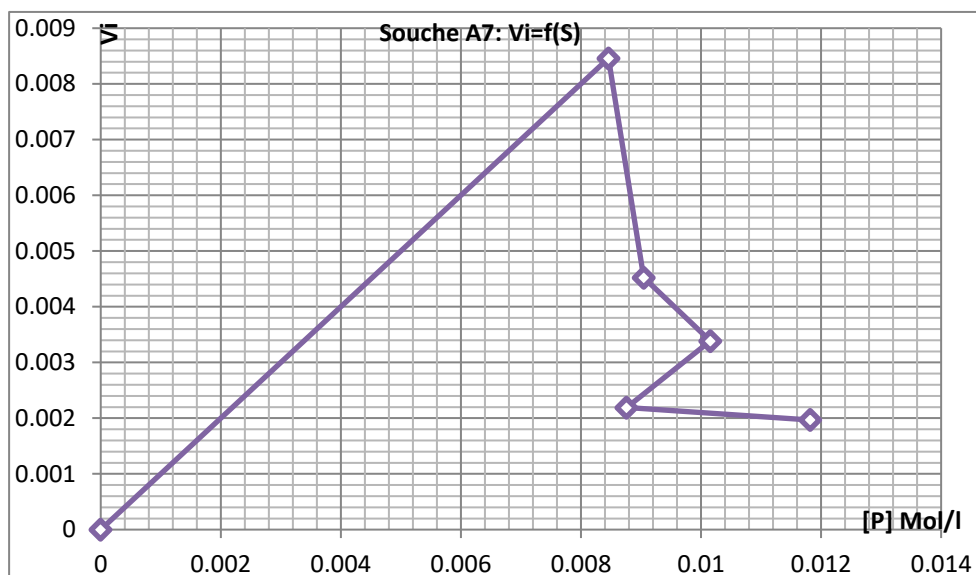


Figure 37 : Cinétique enzymatique de l'extrait d'amylase de la souche A7.

Grâce à ces représentations graphiques expérimentales les constantes cinétiques  $K_m$  et  $V_i$  des extraits d'amylases de différentes souches sont calculées (tab. 6).

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

Les souches	$V_{max}$ [ $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ]	$K_m$	$V_i$ [ $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ]
A1	$13 \times 10^{-6}$	$7,5 \times 10^{-5}$	$11 \times 10^{-3}$
A3	$8 \times 10^{-6}$	$1,2 \times 10^{-5}$	$78 \times 10^{-3}$
A4	$13 \times 10^{-6}$	$1,3 \times 10^{-6}$	$13 \times 10^{-3}$
A6	$15 \times 10^{-6}$	$1,3 \times 10^{-6}$	$14 \times 10^{-3}$
A7	$15 \times 10^{-6}$	$7,9 \times 10^{-6}$	$14 \times 10^{-3}$

Les valeurs du  $K_m$  les plus faibles  $1,3 \times 10^{-6}$ ,  $1,3 \times 10^{-6}$ ,  $7,9 \times 10^{-6}$ ,  $1,2 \times 10^{-5}$  et  $7,5 \times 10^{-5}$  sont notés pour les souches de *Streptomyces* sp. A6, A4, A7, A3 et A1 avec des vitesses supérieures par rapport à la souche A6 (tab. 6). Selon **Cheftel et Cheftel (1977)**, **Cheriot (2007)**, **Karp et al., (2018)** et **Botham et al., (2017)** le  $K_m$  traduit l'affinité de l'enzyme avec le substrat, plus le  $K_m$  est faible plus cette affinité augmente. Les souches de *Streptomyces* sp. A1, A3, A4 et A7 présentent une bonne affinité avec le substrat amidon comparant avec la souche A6. 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 sont les principales enzymes impliquées dans la biodégradation de l'amidon. Ces enzymes possèdent divers applications industrielles réveillent une grande importance biotechnologique dans de nombreuses industries tels : que l'agroalimentaire, pharmaceutique, chimies industrielle, l'écologie etc.

Dans cette étude, cinq souches d'actinobactéries appartenant au genre *Streptomyces* sp ont été isolées à partir du sol de la région de Hassi Mamache (Mostaganem) et identifiés (A1, A3, A4, A6, et A7) et caractérisés morphologiquement par des tests physiologiques et biochimiques. Dans ce travail, l'isolement et l'identification préliminaire des actinobactéries sur un milieu sélectif riche en amidon montrent un nombre relatif plus de dix souches. Cinq isolats (A1, A3, A4, A6, A7) ont été retenus et caractérisés sur la base des observations macroscopiques et microscopiques.

Le développement de ces isolats est plus ou moins rapide (7 à 10 jours), ils présentent des filaments septés, les surfaces des colonies sont aplatie, poudreuses, bombé, etc. La couleur des cinq isolats est différente (blanche, jaune et beige). Le criblage des isolats par le test d'hydrolyse de l'amidon a parmi 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 obtenu présentent des concentrations 0,069 ; 0,097, 0,092 ; 0,093 et 0,102 mg/ml respectivement pour les cinq isolats (A1, A3, A4, A6, A7). L'étude de la cinétique révèle une variation dans les activités amyliques des extraits enzymatiques des cinq souches.

Le dosage des produits libérés au cours des différentes réactions présentent respectivement des valeurs supérieur de  $35 \times 10^{-3}$ ,  $33 \times 10^{-3}$ ,  $2,7 \times 10^{-3}$ ,  $1,6 \times 10^{-3}$  et  $1,2 \times 10^{-3}$  mol glucose /l pour les isolats A1, A3, A4, A6 et A7. En effet, les valeurs du  $K_m$  les plus faibles sont notées respectivement pour les souches de *Streptomyces* sp. A6 et A4 ont la même valeur ( $K_m = 1,3 \times 10^{-6}$ ) ; A7 ( $K_m = 7,9 \times 10^{-6}$ ) et la souche A3 ( $K_m = 1,2 \times 10^{-5}$ ), par rapport à l'isolat A1 ( $K_m = 7,5 \times 10^{-5}$ ). Les valeurs des vitesses initiales sont de  $11 \times 10^{-3}$  ;  $78 \times 10^{-3}$  ;  $13 \times 10^{-3}$  ;  $14 \times 10^{-3}$  et  $14 \times 10^{-3}$  mol l<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup> respectivement pour les cinq isolats (A1, A3, A4, A6, A7). 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 d'électrophorèses et HPLC.
- Suivre la croissance des souches actinomycétale (A1, A3, A4, A6, A7) sur d'autres milieux pour déterminer leurs mécanismes de production de leurs l'enzyme.

- Étudier les cinétiques de l'activité d'amylase purifiée à des pH et températures différents pour des utilisations industrielles.

## *Références bibliographiques*

*Références bibliographiques*

1. **Abbes S., et Bouteraa I., (2017).** Identification phénotypique de quelques isolats d'actinobactéries présentant une activité antimicrobienne vis-à-vis des microorganismes pathogènes. Thèse de MSILA.
2. **Alais C., Linden G. et Miclo L., (2008).** Biochimie alimentaire, DUNOD. 6ème édition, Paris, pp.67-71.
3. **Anderson, I. P. E. & Domsch, K. H., (1978).** Mineralization of bacteria and fungi in chloroform fumigated soils. *Soil Biology and Biochemistry* .10.P207-213.
4. **Atlas, R.M. et Bartha R., (1997).** *Microbial Ecology: Fundamentals and Applications*. Third.
5. **Baize D., et Jabiol B., (1995).** Guide Pour La Description Des Sols, Collection Techniques Et Pratiques, INRA, Paris.
6. **Basha G., Sheik M .G ., Shankar .S., (2017).** *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* , Isolation and characterization of actinomycetes from soil of ad-Dawadmi, Saudi Arabia and screening their antibacterial activities. v9 pp276-279
7. **Belyagoubi L., 2014.** Antibiotiques produits par des bactéries ( actinomycètes et bactéries lactiques) issus de différents écosystèmes naturels Algériens. Laboratoire des produits naturels ( LAPRONA) laboratoire de l'unité molécules de communication et Adaptation des Micro organismes MNHN (Paris).
8. **Bennett J.W., (1998).** *Mycotechnology: the role of fungi in biotechnology*. *J. Biotechnol.*, (66), pp.101-107.
9. **Berthelin, .& Toutain, F., (1979).** Biologie des sols. In Duchaufour P. & Souchier B (eds) *Pédologie*. 2. Constituants et propriétés du sol. Masson, Paris. P121-160.
10. **Bessaad N ., et Saadaoui K., (2017).** contribution à l'étude comparative des activités antibactériennes de deux extraits bruts d'antibiotique et de l'huile synthétisés par des streptomycètes sp isolés des sols de la zone Abdel Malek Ramadan (Mostaganem). Université de Mostaganem.
11. **Blanc. D. 1985.** Les Structures Hors Sol INRA Ed Louis. Paris. p409.
12. **Bloem, J., Lebbink, G., Zwart, K. B., Bouwman, L. A., Burges , S., Devos, J. A. & De Ruiter, P.C., (1994).** Dynamics of microorganisms, microbivores and nitrogen mineralization in winter wheat fields under conventional and integrated management. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 51, P129-143.

13. **Botham M.K., Wail A. et Roswell V.W., (2017).** Biochimie de Harper. traduction de lioneldomenjoud. édition 6<sup>e</sup> :80.
14. **Boudouch O., (2009).** « Étude De Dépollution Des Sols Par Extraction Sous Pression Réduite .Application Au Traitement Des Composes Organique Volatiles ». Thèse De Doctorat. Institut National Des Sciences Appliquées De Lyon.
15. **Boughachiche F., Reghioua S., Zerizer H., et Boulahrouf A. (2012).** Antibacterial activity of rare Streptomyces species against clinical resistant bacteria. Ann Biol Clin., 70:74-169.
16. **Boulaine, J., (1989).** Histoire Des Pédologues Et De La Science Du Sol. Ed. INRA. 285P.
17. **Calvet, R., (2003).** Le Sol : Propriétés Et Fonctions. Tome 1 : Constitution Et Structure, Phénomènes Aux Interfaces. Ed. France Agricole. 456 P.
18. **Cheftel J.C., Cheftel H. H., (1977).** Introduction 0 la biochimie et 0 la technologie des aliments-vol.1.
19. **Cheriet M., Amari S, Benmammar Y, (2016).** Etude de quelques activités enzymatiques d'une collection d'actinomycètes. Université des Frères Mentouri Constantine Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie.
20. **Cheriot S., (2007).** Rôle des produits de la réaction de maillard dans l'inhibition de l'oxydation enzymatique des phénols et des lipides. Thèse agro paris Tee et DOC lavoisier.
21. **Clement, M., et Lozet, J., (2011).** Dictionnaire encyclopédique de science du sol collection : sciences sup company, baltimore, U.S.A. company. Canada, pp.79-82. Eur J Biochem. 240 .p584-591.  
Collections. In Hawks worth D. L. (ed.) *The biodiversity of microorganisms and invertebrates: its role in sustainable agriculture.* CAB International. Wallington, UK. 17-29P.
22. **Collins, C.H., Lynes, P.M. and Grange, J.M. (1995).** Microbiological Methods. (7<sup>th</sup> Edn.) Butterworth- Heinemann Ltd. , Britain, pp.175-190.
23. **Cornil A.V., (1890).** Les bactéries et leur rôle dans l'étiologie et l'histologie p 213.
24. **Dauter. Z., Dauter. M., Brzozowski A.M., Christensen S. Borchert T.V., Beier J., Wilson K.S. et Davies G.J., (1999).** X-ray structure of Novamyl, the five-domain "maltogenic" alpha-amylase from Bacillus stearothermophilus: maltose and a carboxylate complex at 1.7 Å resolution. Biochem. (38): 8385-8392.
25. **Davet P., (1996).** Vie microbienne du sol et production végétale. INRA. Paris. P. 52-57
26. **De Vos, P ; Garrity, G. M ; Jones, D ; Krieg, N. R ; Ludwig, W ; Rainey, F.A ; Schleifer, K. H ; et Whitman, W. B, (2009).** *Bergey's Manual of Systematic Bacterology*, 2nd edition. Volume III, The firmicutes. Springer, New York, USA.

27. **Dommergues Y., et Manganot F., (1970).** Ecologie microbienne du sol. Masson et cie Editeurs, paris, p796.
28. **Doumas, B.T., Bayse, D.D., Carter R.J., Peters, T., End Schaffer, R., (1981).** A candidate reference method for determination of total protein in serum. I. Development and validation. *Clinical chemistry*, 27(10), 1642-1650.
29. **Duchaufour P., (1983).** Abrégé de pédologie. Masson-edition. 220 pages. Ed Masson. Environmental microbiology. Academic press. A Harcourt Science and technology FACT SHEET. Agriculture and natural Resources. The Ohio State University, for poultry, International Scientific symposium : Performances and competitiveness in animal fourth edn : Blackwell publishing.
30. **Duchaufour, P., (1984).** Abrégés De Pédologie. Ed. Masson. Paris, 220P.
31. **Focht, D. D. & Martin, J. P., (1979).** Microbiological and Biochemical Aspects of Semi-arid
32. **Franco O. L., Rigden D. J., Melo F. R., Bloch C., Silva J. C. P. et Crossi de Sa M. F., (2000).** Activity of wheat amylase inhibitors towards bruchid  $\alpha$ -amylase and structural explanation of observed specificities. *Eu. J. Biochem.* 267 : 2166-2173.
33. **Françoise D., Edouard B., Christian M., Marie C.P., Ronald Q., (2012).** Bactériologie médicale. Edition 2<sup>e</sup>, 2012. P : 66.
34. **Gobat .J.M, Aragno M et Matthey, W., (2010).** Le Livre (Le Sol Vivant : Base De Pédologie Et Biologie Des Sols). 3eme Edition Revue Et Augmentée .150-165P.
35. **Gobat J.M., Michel A., Willy M., (2010).** Le sol vivant bases de pédologie- Biologie des sols .Ed 3<sup>ème</sup> : revue et augmentée, page 423.
36. **Gordon R.E. and Smith M.M., (1953).** Rapidly Growing, acid fast bacteria I. Species description of *Mycobacterium phlei*. *J. Bact.*, 66. 41-48.
37. **Habib Semira et Missoum Malika., (2011).** Contribution à l'étude comparative de la microflore des sols rhizosphériques d'*Acacia Raddiana* et d'*Arganier spinosa* de la région d'Oued-El-ma ( Willyade Tindouf). Université Ibn Khaldoun-Tiaret p : 9.13.
38. **Hawksworth, D. L. & Mound., (1991).** Biodiversity databases: the crucial significance of
39. **Hillel, D. 1982.** Introduction To Soil Physics. Ed. Academic Press. New York, USA, 364P.
40. **Hoorman, J. J. et R. Islam., (2010).** Understanding soil microbes and nutrient recycling. [http://www.Univ-Lyon1 .Fr/mycolgie/Sitejabo\\_myco/enseignements/Thèses autres.htm](http://www.Univ-Lyon1.fr/mycolgie/Sitejabo_myco/enseignements/Thèses autres.htm). industrielle. 2ème édition. Masson. Collection Biotechnologies. 34-428P.
41. **Joffin. J.N, Gay L.. (2014).** microbiologie Tome 1, technique. dictionnaires des techniques , Ed 4<sup>ème</sup> pp 102.

42. **Karp G., Isawa J. et Wallace M., (2018).** Biologie cellulaire et moléculaire de karp traduction de F.le sueur- almosni. Edit 4<sup>e</sup> :98.
43. **Khwaja S., Ram Prasad., Santosh K., and Manish D., (2011).** Visavadia. Isolation of soil thermophilic strains of actinomycetes for the production of  $\alpha$ -amylase. .African Journal of Biotechnology Vol. 10(77), Pp. 17831-17836
44. **Khwaja S., Ram Santosh K., Manish D., and Visavadia.,(2011).** Isolation of soil thermophilic strains of actinomycetes for the production of  $\alpha$ -amylase. African Journal of Biotechnology. Vol. 10(77),Pp. 17831-17836.
45. **Koller Emilian.,(2004).** Traitement Des Pollutions Industrielles. Edition DUNOD Paris. 277-347P.
46. **Kottwitz B., Upadek H. et Carrer G., (1994).** Applications and benefits of enzymes in detergent. Chim Oggi, 12, pp.21-4.
47. **Küster E., et Williams S.T., (1964).** Production of Hydrogen Sulfide by *Streptomyces* and Méthods for its détection. Journal. American Society for Microbiology. 1(1) : 46-52.
48. **Kwon – chung K . J., Bennet J.E.,(1992).** Medical Mycology. Lea et Febiger, Londres, 866 pp. croissance de différente plante. Diplôme de docteur de 3<sup>ème</sup> cycle de biologie végétal, la croissance de différente plante. Diplôme de docteur de 3<sup>ème</sup> cycle de biologie végétal,
49. **Laurent P.J., (1982).** l'exploitation physicole des grande lacs francais. Cah.Assoc, internat, Entretiens écol, dijon 11/12,82-97.
50. **lavelle, P & Spain,A.V., (2001).** Soil ecology. kluwer academic publishers. Dordrecht, the Netherlands.p654 .
51. **Leclec H., Buttiaux R., Guillaume J., Watter P., (1977).** Microbiologie appliquée. Ed : Doinditeur, Paris.P81-82.
52. **Leung, K. T, Errampalli, D., Cassidy, M., Lee, H., Hall, B., Trevors, J. T, Okamura, H. & Bach, H.-J.,(1997).** A case study of bioremediation of polluted soil: biodegradation and toxicity of chlorophenols in soil. In: Van Eisas J. D, Trevors J. T & Wellington E. M. H. (eds) Modern soil microbiology. Marcel Dekker, INC. New York. 577-605P.
53. **Lunquist E., Jakson L., Scow K and Hsu C., (1999).** Changes in microbial biomass.

## *Références bibliographiques*

54. **Maier, R. M., I. L. Pepper et C. P. Gerba.,(2000)**. Microorganisms in surface soils. In: **Mechakra A., Auberger B., Remeuf F. & Lenoir J. (1999)**. Optimisation d'un milieu de culture pour la production d'enzymes protéolytiques acides par *Penicillium camemberti*. *Aliments*. 19 (6): P663-675.
55. **Marchal N et Bourdon J.L., (1973)**. Milieux de culture et identification biochimique des bactéries. EdDoin. Paris.
56. **Messiaen C.M., Blancard D., Rouxel F. et Lafon R., (1991)**. Les maladies des plantes maraichères. p48.
57. **Moore, J. C. & De Ruiter, K. H.,(1991)**. Temporal and spatial heterogeneity of tropic interactions within below-ground food-web. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 34,P371-391.
58. **Nadirman H. et Yoshiyuki O.,(2006)**. Mechanism of Hydrolysis of the Treated Starch Granules by Raw Starch Digesting Amylase from *Penicilliumbrunneum*, *Journal Starch Starke*, (7): 25-28.
59. **Nielson J-E., Borchert T-V et Vriend G.,(2001)**. The determinant of -amylase pH-activity profiles. *Protein Engineering*. Oxford University Press. 14(7), p: 505-512.
60. **Normand, P., Navaro, I. &Domenach, A. M.,(2000)**. La symbiose fixatrice d'azote *Frankia* plantes actinorhiziennes. *Bulletin de la Société Française de Microbiologie* 15,241-244.
61. **Nortcliff.S., (2002)**. Standardization Of Soil Quality Attributes. *Agriculture. Ecosystems&Environment* 88(2).161-168P.
62. **Oomah,B.D.,Casper,F.,Malcolmson,L.J.and Bellido, A.S., (2011)**. Phénolics and antioxidant activity of lentil and pea hulls,*Food Research international* 44(1) : 43-441.
63. **Panchal C.J.,(1990)**. Yeats strainselection. Marcel Dekker (ed) USA, p: 189.
64. **Pandey A., Nigam P., Soccol C.R., Soccol V. T., Singh D. et Mohan R.,(2000)**. AdvancesIn. Microbial amylases. *Biotechnology. Appl. Biochem.* (31), pp.135-152.
65. **Pandey A., Nigam P., Soccol V.T., Singh D et Mohan R.,(2000)**. Production and characterisation of fungal amylase enzyme isolated from *Aspergillus* sp. JGI12 in solid state culture. *African Journal of Biotechnology*. 6(5), p: 576-581.
66. **Pansu, M. And Gautheyrou, J., (2001)**. L'analyse Du Sol Minéralogique, Organique Et Minérale. Edition Springer. Phynotypic identification of Actinomyces and related species isolated from Human sources.*j.clin Microbiol.*39(11) :3955-3961.

67. **Ragunathan R., Padhmadass R., (2013).** Production, purification and characterization of  $\alpha$ -amylase using *Streptomyces* spp. PDS1 and *Rhodococcus* spp. Isolated from Western Ghats. Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci 2(8): 206-214.
68. **Redlich G/C Et Verdure., (1975).** Le Comportement Physique Des Tourbes En Cours De Culture PHM. Revue Horticole. 160. 13-20P.
69. **Ruiter, P.C., Zwart, K. B., Bouwman, L. A., (1993).** Moisissures utiles et nuisibles importance Sci. 94 (25): P1595-1604.
70. **Samuel T.G., Barrow G.I., Feltham R.K.A., (2003).** Cowan and steel's Manual for the identification of medical bacteria. Edition 3<sup>th</sup>. p :225.
71. **Sarkanon N., Kononen E., Summanen P., Kononen M., and Somer H J., 2001.**
72. **Schomburg D and Salzmann M., (1991).** Enzyme Hand book 4. Classe 3: Hydrolases Springer-Verlag (ed). Berlin Heidelberg. Germany. p: 1-12.
73. **Shields J J., Vayssier Y., Veau P., (1973).** Moisissures utiles et nuisibles importance Sci. 94 (25): P1595-1604.
74. **Shirling EB, Gottlieb D., (1966)** .Methodes for characterization of *Streptomyces* species. Int J Syst Bacteriol ,16 :313-40.
75. **Six J., Bossuyt H., Degryze S., and Deneef K., (2004).** A history of research on the link between ( micro) aggregates, soil biota, and soil organic matter dynamics. Soil & Tillage research, 79, p.7-31.
76. **Soltner, D., (2004).** Distribution Liquid Et Voie Métabolique Chez Quatres Bactéries Gram négative Hydro carbonoclaste. Variation En Fonction De Sources De Carbone. Docteur De L'université PARIS 6.
77. **Sorensen, I. (1997).** The rhizosphere as a habitat for soil microorganisms. In: Van Elsas J. D,
78. **Sposito, G., (2008).** The Chemistry of Soils. Oxford University Press, New York.
79. **Sposito. G., (1997).** The Chemical Composition Of Soils. The Chemistry Of Soils. Oxford University Press. New-York: 3-27P.
80. **Stolp, H., (1988).** Microbial Ecology: organisms, habitats, activities: Cambridge University Press. New York. P308.
81. **Subramanian K.S. and Charest C., (1998).** Arbuscular mycorrhiza and nitrogen assimilation in maize after drought and recovery. Physiol. Plant. **102** :285-296.
82. **Tate, R. L., (1995).** Soil microbiology. John Wiley & Sons, Inc. New Jersey. USA. P398 .

- 83. Thom, G.,(1997).** The fungi in soil. In: Van Elsas J. D, Trevors J. T. & Wellington E. M. H. (eds) Modern soil microbiology. Marcel Dekker, INC. New York.P 63-127.
- 84. Thomashow, L. S., Weiler, D. M., Bonsall, R. F. & Pierson, L. S.,(1990).** Production of the Antibiotic phenazine -1- carboxylic acid by fluorescent pseudomonas in the rhizosphere of wheat applied and environment microbiology 56,p 908-912.
- 85. Tolan J-S.,(1996).** Pulp and paper. In: Godfrey T, West S., editors. Industrialenzymology, 2nd ed. New York: Stockton Press, pp.327-38.
- 86. Toop, E., Vallaey, T. & Soulas, G.,(1997).** Pesticides: Microbial degradation and effects on microorganisms. In: Van Elsas J. D, Trevors J. T. & Wellington E. M. H. (eds) Modern soil.
- 87. Tortora. G..J ; Funk B.R.; Case C.L.,(2003).** Introduction à la microbiologie. Edition du Renouveau Pédagogique Inc. Pp. 945.
- 88. Trevors, J. T. & Van Elsas, J. D.,(1997).** Microbial Interactions in soil. In: Van Elsas J. D, Références bibliographiques *Trichoderma reesei* – Association and rate constants derived from an analysis of progress.
- 89. Trevors. J. T. & Wellington E. M. H. (eds)** Modern soil microbiology. Marcel Dekker, INC. New York. P21-45.
- 90. Van Der Maarel M.J, Van der Veen B., Uitdehaag J.C.M., Leemhuis H. et Dijkhuizen L., (2002).** Properties and applications of starch converting enzymes of alpha amylase family. *Biotechnol*; 94, pp.137-55.
- 91. Vincent M., (1996).** Blood glucose: Its measurement and clinical importance. *Clinica Chimica*
- 92. Wild, (1993).** Soils and the environment. An introduction, pp. 281. In: Cambridge
- 93. Williams S.T. and Cross T., (1971).** Actinomycetes. *In Methodes in microbiology*. Booth C, Ed., Academic Press, London .4.295-334.
- 94. Young I.M. and Crawford J.W.,(2004).** Interactions and Self-Organization in the Soil Microbe Complex. *Science*, 304(5677): P 1634 -1637.
- 95. Young I.M., Crawford J. W. and Rappoldt C.,(2001).** New methods and models for characterising structural heterogeneity of soil. *Soil and Tillage Research*, 61: 33-45.
- 97. Zidane H., Madi A.,(2017).** optimisation et modélisation de la production des molécules bioactives par une souche d'actinobactérie *Streptomyces* sp. Université de Béjaïa.

**Référence électronique :**

<http://www.mtaterre.fr/dossier-mois/chap/867/Comment-se-forme-le-sol>

# *Annexe*

**I. Composition des milieux de cultures et des solutions****1. les milieux de culture :****Caséine amidon agar**

- Amidon.....10g
- Caséine.....0,03g
- KNO<sub>3</sub>.....2g
- K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.....0,02g
- NaCl.....2g
- MgSO<sub>4</sub> .7H<sub>2</sub>O.....2g
- CaCO<sub>3</sub>.....0,05g
- FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>.....0.01g
- Agar.....18g
- Eau distillée.....1L
- PH= 7.3

**Gélose nutritive**

- Amidon.....10g
- Peptone.....5g
- Extrait de viande.....1g
- Extrait de levure.....2g
- NaCl.....5g
- Agar.....15g
- Eau distillée.....1L
- PH=7.5

**Citrate de Simmons**

- Citrate de sodium..... 1g
- Bleu de bromothymol.....0,08g
- Chlorure de sodium.....5g
- Sulfate de magnésium.....0,2
- Hydrogénophosphate de potassium.....1g
- Dihydrogénophosphate d'ammonium.....1g
- Agar.....15g
- Eau distillée.....1L
- PH=7,1

**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.....1cm<sup>3</sup>
- 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
- Na<sub>2</sub> HPO<sub>4</sub>.....10g
- Extrait de levure.....5g
- KCl.....0,5g
- MgSO<sub>4</sub>.....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 sodium ..... 6g
- NaOH ..... 30g
- Iode de potassium ..... 1g
- $\text{H}_2\text{O}$  : ..... 1L

**Résumé :** Les amylases d'origines microbiennes sont les principales enzymes impliquées dans la biodégradation de l'amidon. Ces enzymes possèdent divers applications industrielles. Dans cette étude, les un sol foresterie de la région de HassiMamèche (Mostaganem) ont fait l'objet d'un isolement et purification des actinomycètes. Après la sélection des souches par des tests biochimiques et physiologiques, une fermentation dans un milieu liquide riche en amidon a été réalisée pour une production des d'amylases. En dernier, les extraits d'amylases obtenus ont été quantifiés par la méthode colorimétrique de Biuret. Afin, de déterminer les paramètres cinétiques  $k_m$ ,  $V_{max}$  et  $V_i$  des extraits enzymatiques, dans des conditions opératoires contrôlés (pH, Température) un milieu réactionnel à base d'amidon a été utilisé. La méthode au réactif de Liqueur de Fehling a été utilisée pour doser les produits (glucose) libéré après hydrolyse du substrat (amidon) par spectrophotométrie à  $\lambda = 540$  nm. Les résultats révèlent macro et microscopiques que les souches d'actinobactéries font partie du genre *Streptomyces* sp. Les colonies obtenues sont des tailles et formes différentes, possédant un mycélium végétatif surmonté d'un mycélium aérien de couleurs différentes jaune, blanche, beige etc. Les isolats sont de Gram positif. L'ensemble des tests biochimiques et physiologiques sont positifs et quelque uns négatifs. Les valeurs cinétiques  $K_m$  les plus faibles ont été notées pour deux isolats *Streptomyces* sp. A6 et A4 ( $K_m = 1,3 \times 10^{-6}$ ) avec les valeurs des vitesses initiales de  $14 \times 10^{-3}$  et  $13 \times 10^{-3}$ . En fin, il est souhaitable de purifier l'enzyme amylase et de la caractériser par les techniques telles que l'électrophorèses et HPLC.

**Mots cléf :** actinomycètes, amylases,  $k_m$ ,  $V_{max}$  et  $V_i$ .

**Abstract :** Amylases of microbial origin are the main enzymes involved in the biodegradation of starch. These enzymes have various industrial applications. In this study, a forestfloor in the region of HassiMameche (Mostaganem) was isolated and purified from actinomycetes. After the selection of the strains by biochemical and physiological tests, a fermentation in a liquid medium rich in starch was carried out for a production of amylases. Finally, the amylase extracts obtained were quantified by the colorimetric method of Biuret. In order to determine the kinetic parameters  $k_m$ ,  $V_{max}$  and  $V_i$  of the enzymatic extracts, under controlled operating conditions (pH, temperature) a starch-based reaction medium was used. The Fehling Liquor Reagent method was used to assay the products (glucose) released after hydrolysis of the substrate (starch) by spectrophotometry at  $\lambda = 540$  nm. The results reveal macro and microscopic that strains of actinobacteria are part of the genus *Streptomyces* sp. The colonies obtained are of different sizes and shapes, possessing a vegetative mycelium surmounted by an aerial mycelium of different colors, yellow, white, beige, etc. The isolates are Gram positive. All biochemical and physiological tests are positive and some are negative. The lowest  $K_m$  kinetic values were noted for two isolates *Streptomyces* sp. A6 and A4 ( $K_m = 1.3 \times 10^{-6}$ ) with initial velocity values of  $14 \times 10^{-3}$  and  $13 \times 10^{-3}$ . Finally, it is desirable to purify the amylase enzyme and characterize it by techniques such as electrophoresis and HPLC.

**Key words** actinomycetes, amylases,  $k_m$ ,  $V_{max}$  and  $V_i$ .

**ملخص :** الأميلازات من أصل ميكروبي هي الإنزيمات الرئيسية المشاركة في التحلل الحيوي للنشاء. هذه الإنزيمات لها تطبيقات صناعية مختلفة. في هذه الدراسة، تم عزل عينة من تربة المزرعة في منطقة حاسي ماماش (مستغانم) وتفتيتها من الأكتينوميستات بعد اختيار السلالات من خلال الاختبارات الكيميائية والفيزيولوجية، تم إجراء عملية تخمير في وسط سائل غني بالنشاء لإنتاج الأميلاز. أخيراً، تم تقدير مستخلصات الأميلاز التي تم الحصول عليها بواسطة طريقة اللونية بيوريت من أجل تحديد المعلمات الحركية  $k_m$ . تم استخدام  $V_{max}$  و  $V_i$  للمستخلصات الأنزيمية في ظل شروط التشغيل الخاضعة للرقابة (درجة الحموضة، درجة الحرارة) وسيطر رد الفعل القائم على النشاء. تم استخدام طريقة محلول فيهلينك لفحص منتجات الجلوكوز (التي تم إطلاقها بعد التحلل المائي لركيزة النشاء بواسطة القياس الطيفي عند  $\lambda = 540$  نانومتر. تكشف النتائج المجهرية بأن سلالات البكتيريا الأكتينية هي جزء من جنس *Streptomyces* sp. المستعمرات التي تم الحصول عليها هي ذات أحجام وأشكال مختلفة، وتمتلك فطار نباتية يعلوها مغزل جوي بألوان مختلفة، أصفر، أبيض، بييج، إلخ. العزلات إيجابية الجرام. جميع الاختبارات البيوكيميائية والفيزيولوجية إيجابية وبعضها سلبية. لوحظت أقل القيم الحركية للكيلومتر لعزلتين *Streptomyces* sp. A6 و A4 ( $k_m = 1.3 \times 10^{-6}$ ) مع قيم السرعة الأولية من  $14 \times 10^{-3}$  و  $13 \times 10^{-3}$ .

أخيراً، من المرغوب فيه تنقية إنزيم الأميلاز وتوصيفه بتقنيات مثل الهجرة الكهربية و HPLC.

**الكلمات المفتاحية:** الأكتينوميستات، الأميلاز، ثابت  $k_m$ ، السرعة المثلى و السرعة الأولية.

