

**République Algérienne Démocratique et Populaire**  
**MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE**  
**SCIENTIFIQUE**  
**Université Mentouri Constantine**  
**Faculté des sciences de la Nature et de la Vie**  
**Département de Biochimie et de Microbiologie**

N° d'ordre : 307/Mag/2010

N° de série : 017/SN/2010

**MEMOIRE**  
**EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME**  
**DE MAGISTER EN MICROBIOLOGIE**  
**Option : ECOLOGIE MICROBIENNE**

**Présenté par :**  
**DJABALLAH Chamsseddine**

**Thème**

**BIODIVERSITE DES ACTINOMYCETES**  
**HALOPHILES ET HALTOLERANTS ISOLES DE**  
**LA SEBKHA DE AIN M'LILA**

**Soutenu le : 04-07-2010**

**Devant le jury :**

<b>Président :</b>	<b>M. BENGUEDOUAR A.</b>	Professeur	Univ. Mentouri-Constantine
<b>Rapporteur :</b>	<b>M. KITOUNI M.</b>	Maître de conférences	Univ. Mentouri-Constantine
<b>Examineur :</b>	<b>M. BENHIZIA Y.</b>	Maître de conférences	Univ. Mentouri-Constantine
	<b>M. BOUDEMAGH A.</b>	Maître de conférences	Univ. Mentouri-Constantine
	<b>M. HADDI M.L.</b>	Maître de conférences	Univ. Mentouri-Constantine

**2009 – 2010**

## *Dédicaces*

*À mon défunt père.*

*À ma très chère mère.*

*À mes sœurs : Hadjer, Sarah, Meriem, Lineb ainsi  
qu'à mon frère Lokmen.*

*À ma très chère fiancée Asma.*

*À toute ma famille et à mes amis Hasim et Adal je dédie ce  
mémoire.*

## *Remerciements*

*Ce travail a été réalisé au sein du laboratoire de Microbiologie Appliquée de l'Université Mentouri de Constantine.*

*Je tiens à remercier avant tous mon encadreur Monsieur Kitouni. (Maitre de Conférences à l'Université Mentouri de Constantine) qui a accepté de superviser ce travail pour toute l'aide qui m'a apporté et sans la quelle ce travail n'aurait pas vu le jour.*

*Je remercie Monsieur Benguedouar A. (Professeur à l'Université Mentouri Constantine) de m'avoir fait honneur de présider mon jury de soutenance.*

*Mes remerciements vont à mes enseignants Monsieur Benhizia Y., Monsieur Boudemegh, A., monsieur Haddi M.L. (Maitre de Conférences à l'Université Mentouri de Constantine) d'avoir accepté d'examiner ce modeste travail.*

*Mes remerciements à Monsieur Bousseboua et Monsieur Boulahrouf A. (Professeur à l'Université Mentouri Constantine) pour m'avoir facilité le travail au laboratoire de Microbiologie Appliquée de l'Université Mentouri de Constantine.*

*Mes remerciements vont à monsieur Belhouane A. qui m'a guidé dans mon étude pédologique du sol au niveau du laboratoire d'écologie, à monsieur Baka M. qui m'a facilité l'accès au laboratoire, ainsi qu'à mon enseignant Monsieur Kadem D.E.D pour ces précieux cours de pédologie.*

*Je remercie mon beau-père Monsieur Louadfel Mourad, ma fiancée Asma, ma sœur Sarah et son fiancé Amir pour toute l'aide qu'ils m'ont apporté durant la période de réalisation de ce travail.*

*Je ne saurais oublier de remercier Mademoiselle Habiba Zerizer, Madame Lamia Kitouni, Mesdemoiselles Karima Loucif, Chelli Radia, Zeyneb Boucherit, Zeyneb Lifa, Sarah Lammi, Amel Daffri, et toutes les doctorantes du laboratoire de Microbiologie Appliquée de l'Université Mentouri de Constantine pour leurs aides et conseils.*

*Je remercie toute ma promotion de Magister, Mesdemoiselles Ibtissem, Meriem, Saliha, Serine, Hadjer, Safia et tous ceux qui ont contribués de près ou de loin à ce travail.*

# Table des matières

Introduction.....	1
<b>Revue bibliographique</b>	
<b>1- Actinomycètes.....</b>	<b>4</b>
1-1- Définition et caractéristiques .....	4
1-2- Ecologie.....	4
1-3- Biologie de développement.....	5
1-3-1- Formation des spores.....	6
1-3-1-1- Les exospores.....	6
1-3-1-2- Les endospores.....	6
1-3-2- Germination des spores.....	6
1-3-3- Mycélium du substrat et mycélium aérien.....	7
1-3-4- Structures particulières.....	7
1-4- Physiologie et métabolisme.....	8
1-4-1- Physiologie.....	8
1-4-1-1- Le taux d' humidité.....	8
1-4-1-2- La température.....	8
1-4-1-3- Le PH.....	8
1-4-1-4- Rapports avec l'oxygène.....	9
1-4-1-5- Matière organique.....	9
1-4-2- Diversité métabolique.....	9
<b>2- Halophilie et halotolérance.....</b>	<b>10</b>
2-1- Définitions.....	10
2-2- Adaptation osmotique des microorganismes halophile.....	11
2-3- Biotechnologie des microorganismes halophiles.....	12
<b>3- Taxonomie des actinomycètes.....</b>	<b>14</b>
3-1- Clé de détermination des groupes d'actinomycétales.....	16
3-2- Clé de détermination des principaux genres d'Actinomycètes.....	16
3-3- Détermination des espèces des genres d'actinomycétales.....	18

## **Partie expérimentale**

1- Prélèvement.....	23
2- Caractéristiques physicochimique du sol des échantillons.....	23
2-1- Mesure du pH des échantillons.....	23
2-2- Pourcentage d'humidité.....	23
2-3- Détermination du taux de la matière organique.....	23
2-4- Mesure de la conductivité de l'extrait aqueux 1/5.....	25
3- Prétraitements des échantillons.....	25
4- Méthodes d'isolement.....	25
5- Observation des colonies au microscope optique.....	26
6- Purification des souches.....	26
7- Conservation des souches.....	26
8- Identification des souches sélectionnées.....	27
8-1- Biodiversité physiologique.....	27
8-1-1- Tolérance au chlorure de sodium.....	27
8-1-2- Croissance à différentes températures.....	27
8-1-3- Croissance à Différents pH.....	27
8-2- Biodiversité morphologique.....	27
8-2-1- Colorations.....	27
8-2-1-1- Préparation des frottis.....	27
8-2-1-2- Coloration de Gram.....	28
8-2-1-3- Coloration de Ziehl- Neelsen (ZN).....	28
8-2-1-4- Coloration de Ziehl- Neelsen modifiée (ZNM)...	29
8-2-1-5- Coloration de Kinyoun modifiée (KM).....	29
8-2-2- Morphologie des mycéliums aérien et de substrat (Technique de culture sur lamelle).....	30
8-3- Biodiversité métabolique .....	30
8-3-1- Production des pigments mélanoides.....	30
8-3-2- Hydrolyse de l'amidon.....	30
8-3-3- Hydrolyse de la gélatine.....	31
8-3-4- Hydrolyse de la caséine.....	31
8-3-5- Action sur le lait écrémé.....	31

## **Résultats et discussion**

1- Caractéristiques des quatre échantillons du sol de Sebkha.....	32
2- Résultats de l'isolement des actinomycètes.....	33
3- Biodiversité physiologique .....	37
3-1- Tolérance au chlorure de sodium.....	37
3-2- Croissance à différentes températures .....	40
3-3- Croissance à Différents pH.....	42
4- Biodiversité morphologique.....	44
4-1- Examen macroscopique et microscopiques des isolats.....	44
4-2- Colorations.....	48
4-3- Technique des lamelles.....	52
5- Biodiversité métabolique.....	67
<b>Conclusion générale et perspectives.....</b>	<b>69</b>
<b>Références bibliographiques.....</b>	<b>72</b>

### **Annexe**

## Liste des tableaux :

<b>Tableau N° 1a</b> : Sucres cellulaires totaux des actinomycètes (Prescott et al.,2003).....	<b>15</b>
<b>Tableau N° 1b</b> : Types pariétaux en fonction des constituants majeurs des parois des actinomycètes (Lechevalier et lechevalier, 1970).....	<b>15</b>
<b>Tableau N° 2</b> : Paramètres physicochimiques des quatre échantillons de sol de la Sabkha.....	<b>32</b>
<b>Tableau N° 3</b> : Type de sol en fonction de la salure et de la conductivité électrique.....	<b>33</b>
<b>Tableau N° 4</b> : Résultats de l'isolement des actinomycètes a partir de l'échantillon N° 4.....	<b>34</b>
<b>Tableau N° 5</b> : Résultats de l'isolement a partir des quatre échantillons sur ISP5 contenant 15% de NaCl .....	<b>34</b>
<b>Tableau N° 6</b> : Nombre des colonies d'actinomycètes sélectionnées par échantillon.....	<b>36</b>
<b>Tableau N° 7</b> : Test de croissance des souches actinomycètes sur le milieu ISP5 et à différentes concentrations de NaCl.....	<b>37</b>
<b>Tableau N° 8</b> : Actinomycètes halophiles et halotolérants croissants à saturation de NaCl.....	<b>38</b>
<b>Tableau N° 9</b> : Test de croissance des souches actinomycétales isolées du sol de Sebka sur les milieux ISP5, Olson, GELM et GLM.....	<b>39</b>
<b>Tableau N° 10</b> : Croissance des 27 isolats d'actinomycètes à différentes valeurs de températures.....	<b>40</b>
<b>Tableau N° 11</b> : Test de croissance des souches actinomycètes sur différentes valeurs de pH.....	<b>42</b>
<b>Tableau N° 12</b> : Résultats des colorations de Gram, de Ziehl-Neelsen, de Kinyoun, et de Kinyoun modifiée.....	<b>49</b>
<b>Tableau N° 13</b> : Genres probables des souches actinomycètes isolées de la sebkha de Ain M'lila .....	<b>66</b>
<b>Tableau N° 14</b> : Biodiversité métabolique des souches actinomycètes du sol de la sebkha.....	<b>67</b>

## Liste des photographies

<b>Photographie N°1</b> : Site de prélèvement (Sebkha de Ain M'lila).....	24
<b>Photographie N°2</b> : (a) Sol de l'échantillon n°1. (b) Sol de l'échantillon n°2. (c) Sol de l'échantillon n°4.....	24
<b>Photographie N° 3</b> : Coloration de Ziehl-Neelsen, de kinyoun, et de Kinyoun modifiée des souches SS21 et SS24 .....	50
<b>Photographie N° 4</b> : Coloration de Ziehl-Neelsen, de kinyoun, et de Kinyoun modifiée des souches SS220 et SS223.....	51
<b>Photographie N°5</b> du mycélium aérien au grossissement (G x100) de la souche SS24.....	53
<b>Photographie N°6</b> de la souche SS2JIM. (a) mycélium aérien au grossissement (G x100), (b) mycélium de substrat au grossissement (Gx40).....	53
<b>Photographie N°7</b> de la souche SS2HA. (a) : mycélium aérien au grossissement (Gx100), (b) : mycelium de substrat au grossissement (Gx40).....	53
<b>Photographie N°8</b> de la souche SS210. (a) mycélium aérien au grossissement ( G x 40), (b) mycélium de substrat au grossissement (Gx100).....	55
<b>Photographie N°9</b> de la souche SS215. au grossissement (G x40). (a) mycélium aérien, (b) mycélium de substrat.....	55
<b>Photographie N°10</b> de la souche SS222. au grossissement (G x40). (a) mycélium aérien, (b) mycélium de substrat .....	55
<b>Photographie n°11</b> du mycélium de substrat au grossissement (G x100) de la souche SS214.....	56
<b>Photographie n°12</b> de la souche SS2A au grossissement (G x100). (a) mycélium aérien, (b) mycélium de substrat.....	56
<b>Photographie n°13</b> de la souche SS223 au grossissement (G x 40). (a) mycélium aérien, (b) mycélium de substrat.....	56
<b>Photographie n°14</b> de la souche SS32 au grossissement (G x 100). (a) mycélium aérien, (b) mycélium de substrat.....	57
<b>Photographie n°15</b> de la souche SS4K au grossissement (G x 40). (a) mycélium aérien, (b) mycélium de substrat.....	57
<b>Photographie n°16</b> du mycélium aérien au grossissement (G x 40) de la souche SS2KHA.....	57
<b>Photographie n°17</b> de la souche SS22 au grossissement (G x 40). (a) mycélium aérien, (b) mycélium de substrat.....	60
<b>Photographie n°18</b> de la souche SS29 au grossissement (G x 100). (a) mycélium aérien, (b) mycélium de substrat.....	60
<b>Photographie n°19</b> de la souche SS217. (a) mycélium aérien au grossissement (G x 100), (b) mycélium de substrat au grossissement (Gx40)	60

<b>Photographie n°20</b> de la souche SS227 au grossissement (G x 100). (a) mycélium aérien, (b) mycélium de substrat.....	<b>61</b>
<b>Photographie n°21</b> de la souche SS23 au grossissement (G x 100). (a) mycélium aérien, (b) mycélium de substrat.....	<b>61</b>
<b>Photographie n°22</b> de la souche SS25 : (a) mycélium aérien au grossissement (G x 100), (b) mycélium de substrat au grossissement (Gx40)	<b>61</b>
<b>Photographie n°23</b> de la souche SS28 au grossissement (G x100). (a) mycélium aérien, (b) mycélium de substrat. ....	<b>62</b>
<b>Photographie n°24</b> de la souche SS220. (a) mycélium aérien au grossissement (Gx100), (b) mycélium de substrat au grossissement (G x40).	<b>62</b>
<b>Photographie n°25</b> de la souche SS21 au grossissement (G x40). (a) mycélium aérien, (b) mycélium de substrat.....	<b>62</b>
<b>Photographie n°26</b> de la souche SS211 au grossissement (G x40). (a) mycélium aérien, (b) mycélium de substrat.....	<b>63</b>
<b>Photographies n°27</b> de la souche SS212. (a) mycélium aérien au grossissement (G x100), (b) mycélium de substrat au grossissement (G x40)	<b>63</b>
<b>Photographies n°28</b> de la souche SS213 au grossissement (G x40). (a) mycélium aérien, (b) mycélium de substrat. ....	<b>63</b>
<b>Photographie n°29</b> de la souche SS228 au grossissement (G x100). (a) mycélium aérien, (b) mycélium de substrat. ....	<b>64</b>
<b>Photographie n°30</b> de la souche SS219 au grossissement (G x40). (a) mycélium aérien, (b) mycélium de substrat. ....	<b>64</b>
<b>Photographie n°31</b> de la souche SS216 au grossissement (G x40) (a), (b) et (c) mycélium aérien, (d) mycélium de substrat.....	<b>65</b>

## Liste des figures :

<b>Figure 1</b> : Diagramme schématique des mycélium aérien et de substrat des Actinomycétales et autres genres de morphologie similaire (Holt et al., 1994).....	<b>19</b>
<b>Figure 2</b> : Technique de culture sur lamelle.....	<b>30</b>
<b>Figure 3</b> : Fluctuation du taux d'actinomycètes isolés en fonction de la conductivité, du taux de la matière organique et du taux d'humidité.....	<b>36</b>
<b>Figure 4</b> : Fluctuation des actinomycètes en fonction de la température....	<b>41</b>

# **Introduction**

## Introduction

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

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

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

L'application de procédés biotechnologique de production de tous les métabolites synthétisés par les actinomycètes et qui sont d'un intérêt pour l'homme serait beaucoup plus intéressante si ces mêmes bactéries productrices de ces métabolites étaient des halophiles (**Oren, 2002**).

L'accumulation dans le sol de quantités excessives de sels solubles caractérise les régions arides et subarides, bien qu'elles se produisent parfois en dehors de ces zones. Là, la pluie ne parvient pas à éliminer les sels qui sont libérés par l'action des agents atmosphériques sur les roches mères, ou qui étaient présent dès l'origine dans les matériaux constitutif du sol. Souvent, les sels ne sont transportés que sur de courtes distances, et, en raison d'un drainage superficiel insuffisant s'accumulent dans les dépressions. C'est de cette manière que les oueds, en Afrique du Nord, en amenant les eaux de pluies dans ces dépressions peu profondes, les rendent salées. Les rivages de la mer, même dans les régions humides, peuvent être salinisés soit par l'action des marées, soit par l'intervention d'une nappe phréatique très chargée de sel et proche de la surface. Un autre cas est celui des petites surfaces salées, localisées, qui résultent de la présence de source chargées de sel (**Bernstein, 1960**).

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

L'objectif principal de ce travail est d'étudier la biodiversité des actinomycètes halophiles et halotolérants dans le sol de la Sebkhah de la région de Ain M'Lila connue par sa salinité élevée. Pour atteindre cet objectif, notre travail devait passer par deux phases.

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

L'identification des souches isolées jusqu'au niveau genre, en étudiant leurs caractères morphologiques, physiologiques et biochimiques, représente la deuxième phase de ce travail.

# **Revue Bibliographique**

## 1- Actinomycètes

### 1-1- Définition et caractéristiques

Les véritables *Actinobacteria*, également connus sous le nom d'actinomycètes, sont des microorganismes à coloration de Gram positive. Ils ont un type de croissance mycélien (les cellules produisent des filaments et des ramifications) rappelant celui des champignons filamenteux. Un des premiers organismes étudiés dans ce groupe est le genre *Actinomyces* qui a donné son nom au groupe (Perry *et al.*, 2004).

Le mycélium peut être stable ou fragmentaire. Dans le cas où le mycélium est de type fragmentaire, l'observation des éléments auxquels il se fragmente et de leur mobilité peut être une source importante à l'identification du microorganisme en cause. A titre d'exemple, le mycélium des espèces appartenant au genre *Oerskovia* se fragmente en éléments flagellés mobiles.

Cependant, si le mycélium est stable, trois cas sont envisageables :

- Soit seul le mycélium végétatif (appelé aussi : mycélium de substrat ou mycélium de base) est formé, ce qui est très commun. La croissance a lieu soit au sein, soit à la surface du milieu gélosé. Le mycélium est coénocytique, donc dépourvu de septum.

- Soit il y a formation des deux mycéliums : aérien et de substrat. En effet, quelques genres produisent en plus du mycélium de base, un mycélium aérien qui, dans certains cas, produit des spores spéciales de reproduction appelées : conidies ou conidiospores.

- Soit, seul le mycélium aérien est formé, ce qui est extrêmement rare. C'est le cas des espèces appartenant au genre *Sporichthya*.

La plupart des actinomycètes sont immobiles. Toutefois, certains types produisent des spores flagellées, permettant leur dispersion dans les habitats aquatiques.

### 1-2- Ecologie

Malgré les recherches considérables, l'écologie des actinomycètes n'est pas encore bien comprise.

Les actinomycètes sont les habitants communs du sol. Leur production de géosmine et de MIB (2-méthyl isobornéol), contribue significativement à l'odeur caractéristique du sol. Ils sont, souvent, moins reconnus en tant qu'organismes importants du sol comme est le cas des cyanobactéries et des champignons tel que *Penicillium sp.* et *Chaetomium sp.* qui sont des producteurs importants de ces métabolites (Zaitlin et Watson, 2006).

Dans la rhizosphère, les actinomycètes appartenant au genre *Frankia* sont extrêmement importants pour de nombreux types de plantes. Cette importance réside dans le fait qu'elles sont capables de noduler les racines de ces plantes et de fixer l'azote atmosphérique. Cette association est appelée : association actinorhizienne (Prescott et al., 2007).

Les actinomycètes ont été également isolés dans de nombreux environnements aquatiques. Ils ont été isolés à partir des eaux de mer et sédiments marins (Jensen et al., 1991 ; Ghanem et al., 2000) ; d'eau douce (Kitouni et al., 2005) et dans les marécages salés (Al-Zarban et al., 2002 ; Boughachiche et al., 2005).

Les actinomycètes se rencontrent également sur les débris des végétaux qu'on trouve au bord des rivières et des lacs, les champs de riz (Wang et al., 2006) et les cavernes naturelles (Lee, 2006), Beaucoup sont capables de sporuler, ce qui leur permet de survivre en conditions défavorables tel que la salinité (Zaitlin et Watson, 2006). Cette propriété joue un rôle principal dans leur distribution.

### **1-3- Biologie de développement**

La diversité morphologique est un caractère tout à fait remarquable des actinomycètes. Cette diversité morphologique se traduit le plus souvent par une différenciation importante et l'existence d'un cycle biologique semblable à celui de certains eucaryotes.

Ainsi, les actinomycètes les plus différenciés développent sur un milieu gélosé une masse d'hyphes mycéliens répartis en deux couches distinctes : le mycélium aérien et le mycélium du substrat. Selon les cas, des spores peuvent se former sur le mycélium aérien

ou sur le mycélium du substrat ou les deux à la fois, elles permettent la propagation de la souche.

### **1-3-1- Formation des spores**

#### **- Les exospores**

Les actinomycètes forment généralement des exospores qui peuvent avoir des formes très variables. Elles se développent par septation des extrémités du filament, habituellement en réponse à une privation en éléments nutritifs. La plupart ne sont pas particulièrement résistantes à la chaleur, mais supportent bien la dessiccation et ont, de ce fait, une importante valeur adaptative (**Prescott *et al.*, 2007**).

#### **- Les endospores :**

Les endospores sont produites par des actinomycètes thermophiles. Elles naissent d'une réorganisation du cytoplasme avec formation d'une nouvelle paroi dans l'hyphe.

Tout comme les endospores bactériennes du genre *Bacillus* (une bactérie à coloration de Gram positive qui a des spores très résistantes à la chaleur), les spores des *Thermoactinomyces* contiennent de l'acide dipicolinique à une concentration de 6.5 à 7% (poids/poids), ce qui est inférieur à la concentration retrouvée dans les spores de *Bacillus*. Cet acide, probablement situé dans la partie centrale de la spore, est un composé unique qui est retrouvé exclusivement chez les cellules non végétatives et il pourrait jouer un rôle dans la résistance des spores à la chaleur. De grandes quantités d'ions calcium et magnésium sont également associées à la présence de cet acide dans la spore. Les endospores des thermo-actinomycètes peuvent rester viables dans le sol pendant de nombreuses décennies (**Sykes et Skinner, 1973**).

### **1-3-2- Germination des spores**

C'est une séquence de changements morphologiques de la spore en structure végétative. Quatre étapes distinctes sont décrites : l'activation, l'initiation, l'émergence du tube germinatif et enfin la croissance.

### **1-3-3- Mycélium du substrat et mycélium aérien**

Le mycélium du substrat, également dénommé mycélium végétatif ou primaire, se développe à partir du tube de germination issu de la spore (**Theilleux, 1993**). La croissance des hyphes est apicale et l'ensemble de la colonie se développe radialement. Le mycélium éventuellement pigmenté, forme des parois transversales isolant les zones les plus âgées. La largeur des filaments mycéliens varie de 0.5 à 2  $\mu\text{m}$ .

Le mycélium primaire est ancré dans le support solide dans lequel il puise ses nutriments. Cette habitude de formation de mycélium de substrat montre la capacité des actinomycètes à dégrader la matière organique insoluble grâce à leurs enzymes extracellulaire (**Locci, 1976**).

Sur le mycélium primaire se développe un mycélium secondaire aérien, ces hyphes aériennes sont plus épaisses et beaucoup moins ramifiées que les hyphes du substrat. Elles sont en général pigmentées et enfermées dans une enveloppe externe hydrophobe.

Le mycélium du substrat est aérobic facultatif, par contre le mycélium aérien est aérobic strict (**Silvey et Roach, 1975**). Les actinomycètes aquatiques sont habituellement dépourvus de ce type de croissance (mycélium aérien).

Divers mutants de streptomycètes sans mycélium aérien ou incapables de sporuler ont été décrits (**Chater et Merrick, 1979**).

### **1-3-4- Structures particulières**

Certains actinomycètes forment des structures particulières (sclérotés, sporanges, synemata,...) qui ne correspondent ni au mycélium ni aux spores et dont la fonction n'est pas toujours définie.

**Les sclérotés** trouvés chez *Chainia* sont constitués par une masse d'hyphes cloisonnées dont les vacuoles sont chargées de glycérides et d'acides gras ramifiés.

**Les sporanges** sont des sacs contenant des spores. Ils peuvent être rencontrés sur le mycélium aérien bien développé ou sur la surface de colonies dépourvues ou ayant un mycélium aérien peu développé.

**Les synnemata**, appelés également corémies, sont des assemblages compacts d'hyphes dressées, parfois fusionnées et portant des conidies apicales ou latérales (**Theilleux, 1993**). Cette structure est caractéristique du genre *Actinosynnema*.

## 1-4- Physiologie et métabolisme

### 1-4-1- Physiologie

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

#### - Le taux d'humidité

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

#### - La température

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

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

#### - Le pH

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

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

### **- Rapports avec l'oxygène**

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

### **- Matière organique :**

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

### **1-4-2- Diversité métabolique**

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

C'est grâce à leur diversité métabolique, c'est à dire à leur capacité à utiliser une large gamme de source de carbone et d'énergie, et à croître dans des conditions très variées, que les actinomycètes peuvent vivre dans des habitats très différents. D'ailleurs, grâce à cette diversité métabolique, les actinomycètes jouent un rôle extrêmement important dans la minéralisation de la matière organique par production d'enzymes extracellulaires, ce qui améliore les récoltes par la fertilisation du sol.

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

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

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

## 2- Halophilie et halotolérance

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

### 2-1- Définitions

Il existe différentes catégories de microorganismes halotolérants :

Les microorganismes **non-tolérants** sont ceux qui tolèrent seulement une faible concentration de NaCl (environ **1%** poids/volume) ; les microorganismes **halotolérants faibles**, tolèrent jusqu'à **6-8%** ; les microorganismes **halotolérants modérés** tolèrent jusqu'à **18-20%** et les microorganismes **halotolérants extrêmes** qui tolèrent des concentrations de sel qui varient de **zéro** jusqu'à **saturation** (**Tiquia, 2006**).

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

NaCl et incapables de croître sur une concentration de NaCl inférieure à **12%** (Yoshida, 1991).

## **2-2- Adaptation osmotique des microorganismes halophiles**

Il existe une diversité considérable dans les mécanismes utilisés par les microorganismes halophiles et halotolérants pour résister à la pression osmotique exercée par la très haute salinité de leurs milieux. Puisque toutes les membranes biologiques sont perméables à l'eau, tous les microorganismes doivent maintenir leur cytoplasme au moins, en iso-osmose avec leur environnement. Dans tous les cas, les ions  $\text{Na}^+$  sont exclus du cytoplasme autant que possible.

Il est à noter que tous les microorganismes halophiles contiennent des mécanismes de transport puissants, basés généralement sur les « **antiporteur  $\text{Na}^+/\text{H}^+$**  » pour expulser les ions  $\text{Na}^+$  du milieu intracellulaire.

Deux principales stratégies sont utilisées par différents groupes de microorganismes. Elles sont basées sur le principe de créer une haute pression osmotique dans le cytoplasme, tout en gardant une faible concentration en  $\text{Na}^+$  (Oren, 2002).

La première stratégie est celle basée sur l'accumulation des ions  $\text{K}^+$  et  $\text{Cl}^-$  pour maintenir l'équilibre de la balance osmotique. Ce mécanisme est utilisé par un nombre limité d'halophiles.

Une deuxième stratégie basée sur une expulsion intensive des sels du cytoplasme et une accumulation de solutés organique afin de fournir et de soutenir la balance osmotique. Cette stratégie est largement utilisée dans les trois domaines ***Bacteria***, ***Archaea*** et ***Eucarya***. Le soluté le plus utilisé dans le domaine ***Bacteria*** est l'éctoine (synthétisée par une large variété de microorganismes) et à un moindre degré la glycine betaine (synthétisée exclusivement par les procaryotes photosynthétiques, mais accumulés par beaucoup de bactéries hétérotrophes à partir du milieu).

Parmi les actinomycètes halophiles nous pouvons citer ***Nocardiopsis kunsanensis*** (Chun *et al.*, 2000) isolée de tables de sel, ***Nocardiopsis salina*** (Li *et al.*, 2006) isolée

d'un sol hypersalin ; et *Saccharomonospora halophila* (Al-Zarban, 2002) isolée d'un sol de marécage au Koweït.

### **2-3- Biotechnologie des microorganismes halophiles**

Les microorganismes halophiles avaient trouvé plusieurs applications en biotechnologie. Certaines de ces applications existent depuis des siècles, avant même la compréhension des processus microbiens.

Dans les années récentes, le nombre des microorganismes halophiles utilisés en biotechnologie avait augmenté et des applications nouvelles sont en voie de développement.

L'utilisation des halophiles en biotechnologie peut être divisée en trois catégories (Oren, 2002) :

**1<sup>ère</sup> catégorie** : l'halo-tolérance de plusieurs enzymes, extraites de microorganismes halophiles, peut être exploitée chaque fois que les transformations enzymatiques requièrent une faible activité d'eau : c'est le cas d'un milieu à concentration élevée en sel.

**2<sup>ème</sup> catégorie** : certains stabilisateurs osmotiques organiques présentent des applications intéressantes (éctoïne et hydroxyéctoïne).

**3<sup>ème</sup> catégorie** : certains microorganismes halophiles peuvent produire des composés de valeur, le plus souvent sans aucune connexion directe avec leurs propriétés halophiles. Ces composés sont également produits par des microorganismes non halophiles, mais les halophiles peuvent présenter des avantages distinctifs pour le développement de processus biotechnologiques de production.

De nombreux genres, notamment *Streptomyces*, produisent d'importants antibiotiques commercialisés et une collection d'autres métabolites secondaires. Ces derniers incluent les alcools aliphatiques, les lactones, les sulphides biogéniques, les cétones, les esters, les thioesters, les furanes et isoprénoides. Leurs applications ont été rapidement reconnues à cause de leur utilisation dans le domaine de recherche en tant

qu'antibiotiques, enzymes, inhibiteurs d'enzymes et autres composés utilisés dans le domaine pharmaceutique (**Zaitlin et Watson, 2006**).

On peut citer à titre d'exemple comme inhibiteur enzymatique : Cyclothialidine qui est un potentiel inhibiteur de gyrase isolé de *Streptomyces filipinensis* (**Angehrn et al., 2004**).

Les inhibiteurs d'enzymes peuvent également être produits à partir d'actinomycètes marins tel qu'un inhibiteur de la  $\beta$ -glucosidase (enzyme impliquée dans les métastases tumorales et le virus d'immunodéficience humaine) synthétisé par *Streptomyces galbus*, et l'inhibiteur de N-Acétyl- $\beta$ -D-glucosaminidase (enzyme présente à des taux sensiblement élevés chez les patients atteints de diabète, de leucémie et de cancer) synthétisée par une espèce appartenant au genre *Streptomyces* (**Imada, 2005**).

Les actinomycètes synthétisent aussi une grande panoplie d'enzymes qui sont d'une grande valeur commerciale. Nous citons à titre d'exemple :

- La tyrosine hydroxylase synthétisée par une espèce appartenant au genre *Streptomyces* et qui permet la synthèse de 3.4-Dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) à partir de la tyrosine. La L-DOPA est utilisée de manière intensive dans le traitement de la maladie du Parkinson (**Sukumaram et al., 1979**).

- Les cellulases, synthétisées par certaines espèces actinomycétales tel que *Streptomyces cellulolyticus* (**Li, 1997**) et *Streptomyces thermocrophilus* (**Kim et al., 2000**), ont une grande valeur commerciale. Elles sont utilisées en industrie pharmaceutique dans des formules médicamenteuses à vocation d'aide digestive. Une production significative de ces enzymes est orientée vers trois marchés principaux : l'industrie alimentaire où les cellulases sont utilisées pour faciliter la filtration des diverses suspensions riches en fibres cellulosique, l'industrie textile où elles sont utilisées pour le traitement des toiles de coton et dans la fabrication de pâte à papier où l'addition de cellulases aux suspensions de pâtes en cours de lavage et surtout aux suspensions de pâtes de recyclage améliore significativement leur filtrabilité et conduit à des économies importantes de consommation d'eau (**Scriban, 1993**).

- Les actinomycètes synthétisent aussi les xylanases. Une utilisation très prometteuse de ces enzymes est en cours de développement industriel : elles peuvent

remplacer l'utilisation des composés chlorés pour le blanchiment des pâtes de papier  
(Scriban, 1993).

### 3- Taxonomie des actinomycètes

L'étude des actinomycètes a pris son ampleur surtout après la découverte de l'aptitude de certains genres de ce groupe à produire des antibiotiques. En effet, la classification des actinomycètes est passée par plusieurs phases.

D'abord, les procédures d'identification étaient, principalement, basées sur la morphologie, la pigmentation et les caractères de croissance sur des milieux composés de substrats complexes naturels. Avec de tels milieux, les chercheurs pouvaient observer une variété de pigmentations et différents types de colonies produites par le même microorganisme. Ceci conduisait, le plus souvent, à des erreurs d'interprétations des résultats. Et dans le but d'aider à l'identification des groupes d'actinomycètes producteurs d'antibiotiques, une investigation intensive de leur utilisation des substrats carbonés dans des milieux à composition chimiquement définie, avait commencé (**Pridhan et Gottlieb, 1948**).

Ensuite, l'analyse chimique de la paroi cellulaire des actinomycètes avait été intensivement explorée. Ce n'est qu'à ce moment que des groupes stables ont été établis (**Keast *et al.*, 1984**).

En effet, la composition chimique de la paroi cellulaire des actinomycètes a une valeur taxonomique élevée et elle varie fortement d'un groupe à l'autre. On peut distinguer quatre types principaux de paroi sur la base de trois critères caractérisant la composition et la structure du peptidoglycane : l'acide aminé en position 3 du tétrapeptide, la présence de glycine dans les ponts interpeptidiques et le contenu en sucre du peptidoglycane (tableau n°1a) (**Prescott *et al.*, 2003**).

La plupart des actinomycètes possèdent une paroi cellulaire type I à type IV (tableau 1b) avec des peptidoglycanes contenant l'acide L-diaminopémilique (DAP) et glycine (Type I) ; méso-DAP et glycine (Type II) ; méso-DAP (Type III) ou méso DAP avec arabinose et galactose (Type IV).

Les extraits cellulaires des actinomycètes munis d'une paroi de type II, III et IV, c'est-à-dire les actinomycètes à acide méso-diaminopimélique sont les seuls qui contiennent des sucres caractéristiques (arabinose, galactose, madurose et xylose).

Cependant, la paroi de certains actinomycétales peut contenir d'autres sucres tels que le fucose qui rentre dans la composition de la paroi de certaines espèces appartenant aux genres *Frankia* et *Actinoplanes* ; le rhamnose avec le galactose qui peuvent orienter le diagnostic d'identification vers certaines espèces appartenant au genre *Saccharothrix*, et le mannose avec le rhamnose et le galactose caractérisant le genre *Streptoalloteichus*.

**Tableau n°1a** : Sucres cellulaires totaux des actinomycètes (Prescott *et al.*, 2003).

Profil de sucres	Sucres caractéristiques	Genres représentatifs
A	Arabinose, Galactose	<i>Nocardia</i> , <i>Rhodococcus</i> , <i>Saccharomonospora</i>
B	Madurose	<i>Actinomadura</i> , <i>Streptosporangium</i> , <i>Dermatophilus</i>
C	Aucun	<i>Thermomonospora</i> , <i>Actinosynnema</i> , <i>Geodermatophilus</i>
D	Arabinose, Xylose	<i>Micromonospora</i> , <i>Actinoplanes</i>

**N.B** : Le madurose est le 3-O-méthyl-D-galactose.

**Tableau n°1b** : Types pariétaux en fonction des constituants majeurs des parois des actinomycètes (Lechevalier et Lechevalier, 1970).

Types de paroi	Constituants majeurs	Exemple de genres
I	LL-DAP	<i>Streptomyces</i>
II	Méso ou hydroxy-DAP Glycine, xylose, arabinose	<i>Micromonospora</i>
III	Méso-DAP, madurose ou aucun sucre	<i>Actinomadura</i>
IV	Méso-DAP, arabinose, galactose	<i>Nocardia</i>
V	Lysine, ornithine	<i>Actinomyces israelii</i>
VI	Lysine	<i>Oerskovia</i>
VII	DAB, glycine	<i>Agromyces</i>
VIII	Ornithine	<i>Cellulomonas</i>

DAP : Acide 2.6-diaminopimélique ; DAB : Acide 2.4-diaminobutirique.

En plus de la composition chimique de la paroi, la morphologie et la couleur des mycéliums et des sporanges, certaines autres propriétés sont aussi précieuses en taxonomie : les caractères de surface et la disposition des conidiospores, le pourcentage en

GC de l'ADN, la composition phospholipidique des membranes cellulaires et la résistance des spores à la chaleur.

Des techniques plus nouvelles ont été appliquées à la taxonomie des actinomycètes. Les méthodes basées sur la PCR avaient apporté une voie rapide et fiable pour l'identification des bactéries y compris les actinomycètes. Parmi ces méthodes, l'analyse des fragments de restriction de l'ADNr (ARDRA : amplified rDNA restriction analysis) s'est révélée précieuse à l'identification d'espèces pathogènes appartenant aux genres *Actinomadura*, *Gordonia*, *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Saccharomonospora*, *Saccharopolyspora*, *Streptomyces* et *Tsukamurella*.

Cette méthode a été également appliquée à l'identification des actinomycètes du sol. L'ADNr 16S d'actinomycètes telluriques sera amplifié puis digéré sous l'action d'endonucléases sélectionnées. Les fragments générés seront séparés par électrophorèse sur gel d'agarose. Le profil obtenu d'une souche inconnue sera comparé avec d'autres profils d'espèces actinomycétales validement publiées. Le genre *Streptomyces* pourra être différencié des autres genres actinomycétales en utilisant uniquement quatre endonucléases de restriction ; Sau3AI, AsnI, KpnI and SphI (Cook et Meyers, 2003).

### **3-1- Clé de détermination des groupes d'actinomycétales :**

La forme LL, méso ou hydroxylée de l'acide 2.6-diaminopimélique et le spectre glucidique d'hydrolysats cellulaires permettent de déterminer les groupes de genres les plus courants d'actinomycètes selon la clé suivante :

- LL-DAP : streptomycètes et apparentées.
- méso-DAP ou hydroxy-DAP :
  - o xylose et arabinose : actinoplanètes.
  - o madurose : maduromycètes, actinomycètes à sporange multiloculaires.
  - o arabinose et galactose : nocardiformes.
- pas de sucres, ni d'acide aminé caractéristiques : *Thermonospora* et apparentés, *Thermoactinomyces*.

### **3-2- Clé de détermination des principaux genres d'Actinomycètes :**

L'étude des caractères chimiques et morphologiques (**Figure 1**) permet de déterminer les genres les plus courants correspondant aux types pariétaux I, II, III et IV. Nous donnons ci-après pour chacun de ces types la description sommaire de genres importants.

Genres contenant du LL-DAP :

- *Streptomyces* : il y'a formation de mycéliums primaire et aérien abondants. De longues chaînes de spores se forment sur les hyphes aériens et plus rarement sur le mycélium primaire.
- *Streptoverticillium* : semblable à *Streptomyces* mais les sporophores sont disposés en verticilles.

Genres contenant du méso-DAP et de la glycine ainsi que du xylose et de l'arabinose :

- *Micromonospora* : le mycélium aérien ne se développe pas ou seulement pauvrement. Des spores sont formées individuellement sur le mycélium primaire. La sporulation est souvent abondante et les spores forment des grappes.
- *Actinoplanes* : sur le mycélium aérien peu développé se forment de nombreux groupes globuleux, lagéniformes ou irréguliers. Ils contiennent de nombreuses spores globuleuses avec une touffe polaire de flagelles.
- *Dactylosporangium* : semblable à *Actinoplanes* mais des mérosporangies digitiformes sont formés en groupe. Les spores sont globuleuses à ovales et possèdent une touffe de flagelles polaires. Souvent se formant des cellules globuleuses sur le mycélium primaire.

Genres contenant du méso-DAP mais aucun glucide caractéristique :

- *Actinosynnema* : le mycélium de substrat forme des corémies sur lesquelles se développent des hyphes aériennes. Ces hyphes se désagrègent pour donner des spores à flagelles péritriches.

Genres contenant du méso-DAP et du madurose :

- *Actinomadura* : il existe un mycélium primaire et un mycélium secondaire. Les spores sont en chaînes courtes.

- *Streptosporangium* : un mycélium du substrat et un mycélium aérien sont produits. Les spores immobiles sont formées au sein de sporanges globuleux.

Genres contenant du méso-DAP de l'arabinose et du galactose :

- *Nocardia* : ce genre est de morphologie très variable. Le mycélium aérien peut être pauvre ou abondant. Le mycélium primaire se fragmente en éléments de formes extrêmement variées.
- *Saccharopolyspora* : Le mycélium primaire se fragmente et le mycélium primaire est segmenté en spores.

### 3-3- Détermination des espèces des genres d'actinomycétales :

En plus des caractères morphologiques (Figure 1) et chimiques, la caractérisation et la détermination des espèces se basent sur des caractères physiologiques (température et pH optimaux, utilisation de sources carbonée et azotée...) et biochimiques (dégradation de certains substrats tel que la gélatine...). L'ensemble des caractères morphologiques et biochimiques peut servir à définir des coefficients de similarité entre les organismes. C'est la taxonomie numérique. Elle a été utilisée pour redéfinir les espèces des genres *Streptomyces* et apparentés (Williams *et al.*, 1983). Des analyses numériques ont été également effectuées avec les espèces des genres *Actinomadura*, *Mycobacterium*, *Nocardia* et *Nocardiopsis* (Goodfellow et Cross, 1984).

Cependant les clés de détermination les plus couramment utilisées restent actuellement celles du « Bergey's Manual of Systematic Bacteriology », 8<sup>ème</sup> Edition.

Pour les espèces du genre *Streptomyces* : le plus important, cette clé (Gottlieb, 1974) exploite largement les travaux de « l'international *Streptomyces* project » qui a conduit à la redescription homogène à l'aide de méthodes standardisées de plus de 450 espèces de *Streptomyces* (Shirling et Gottlieb, 1966).

Cette clé s'appuie sur les caractères principaux suivants :

- la couleur du mycélium aérien sporulé ;
- la forme des chaînes de spores ;
- la production de pigments mélanoides ;
- l'ornementation de paroi sporale ;

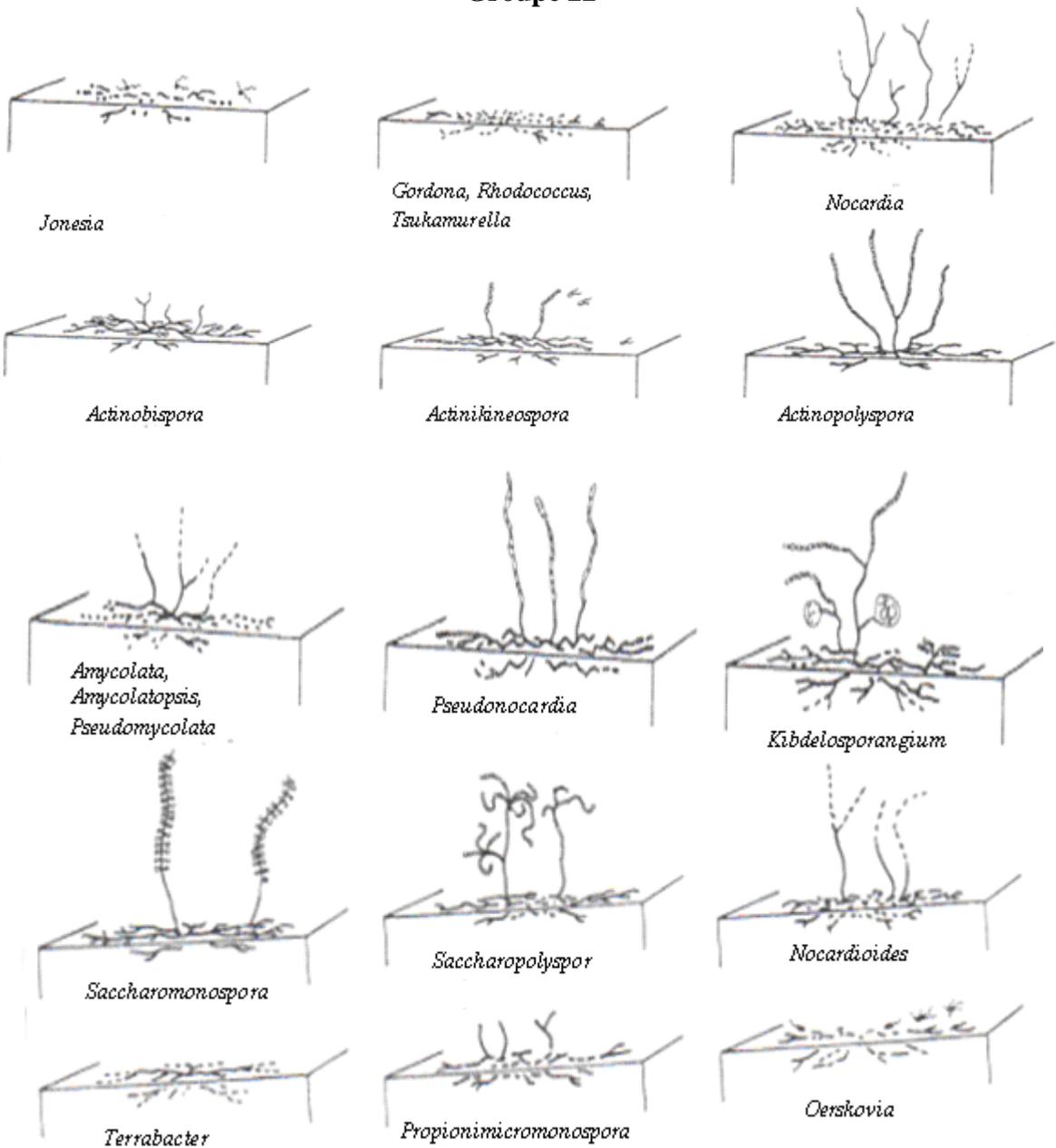
- la capacité d'utiliser certaines sources de carbone pour se développer.

Lorsque la description d'une souche nécessite l'étude d'autres caractères, il est possible de recourir à l'examen d'une centaine de critères morphologiques et biochimiques supplémentaires dont les trois quart correspondant à la recherche de l'utilisation de sources de carbone et d'azote (**Pridham et Gottlieb, 1968**).

**Groupe 20**



**Groupe 22**

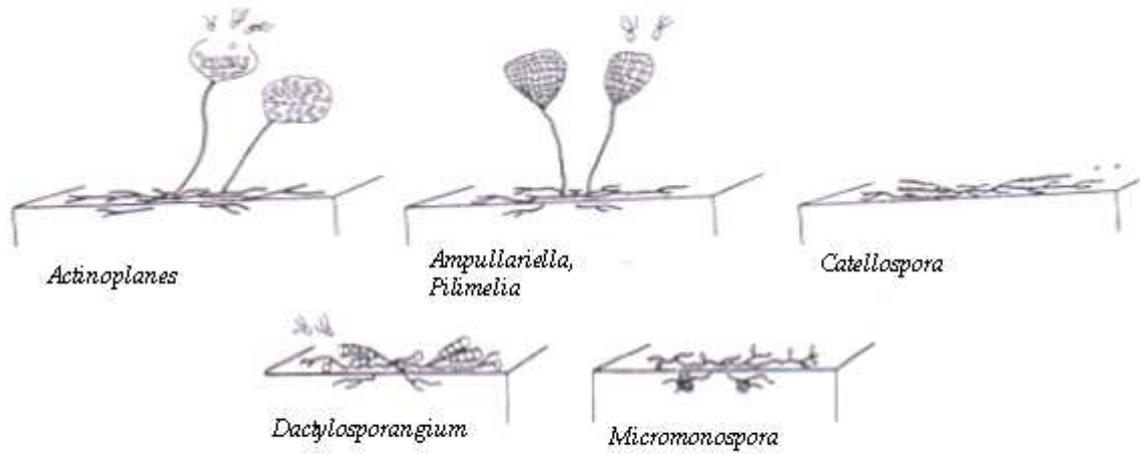


**Figure 1 : Diagrammes schématiques des mycéliums aérien et de substrat des Actinomycetales et autres genres de morphologies similaires (Holt *et al.*, 1994).**

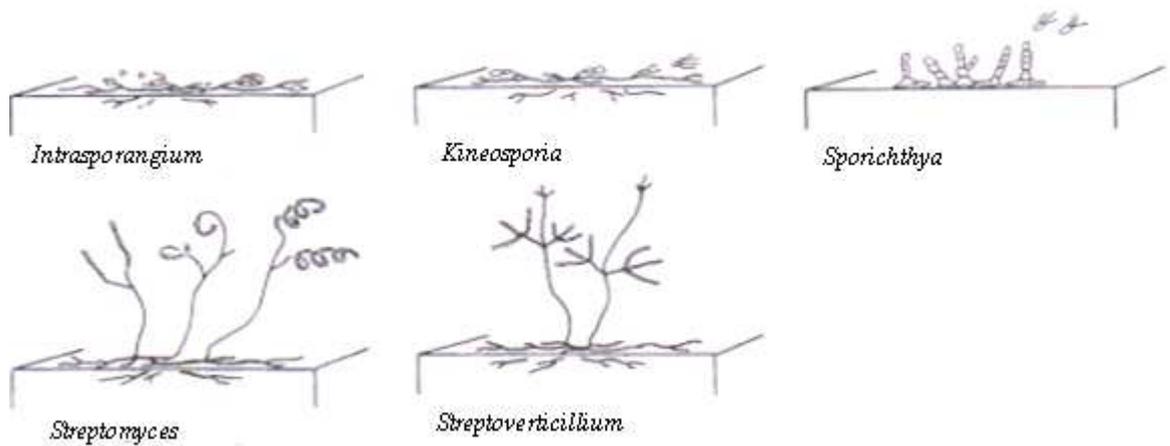
**Groupe 23**



**Groupe 24**

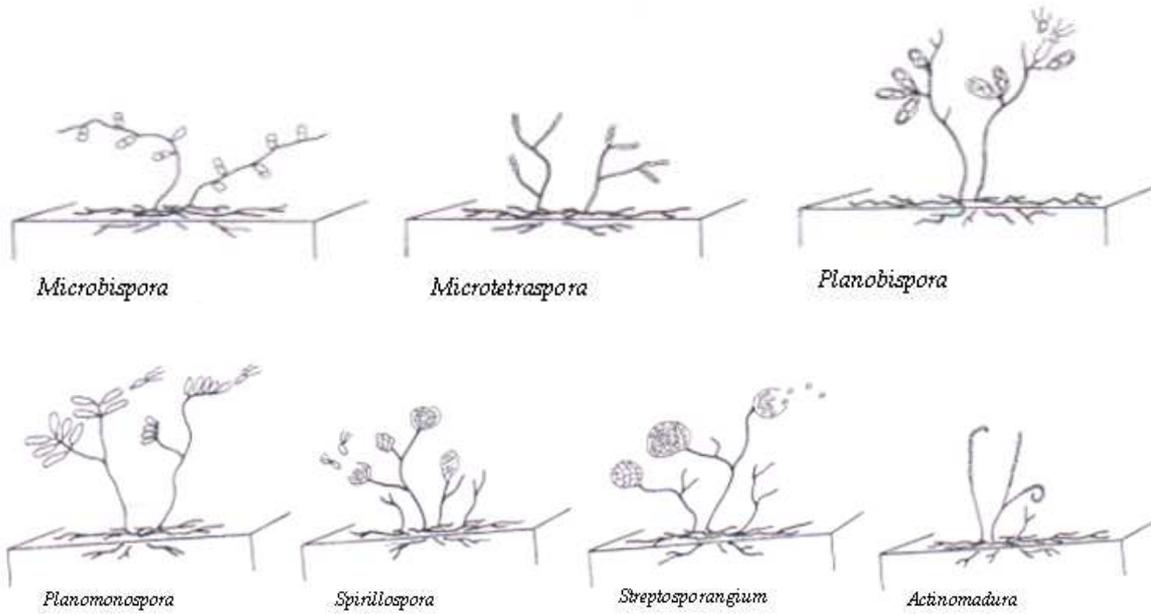


**Groupe 25**

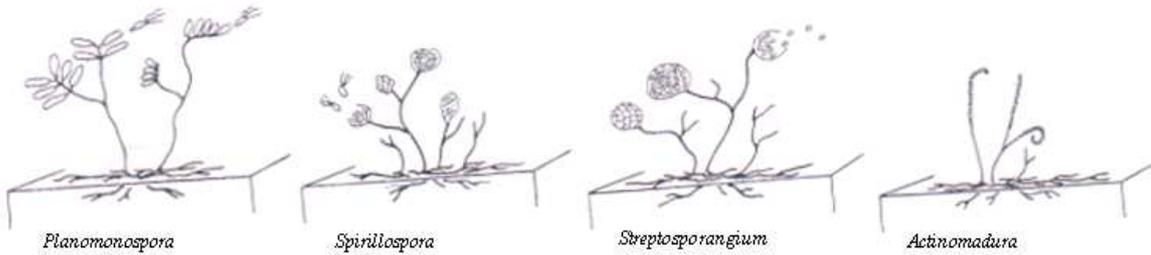


**Figure 1 (Suite): Diagrammes schématiques des mycéliums aérien et de substrat des Actinomycetales et autres genres de morphologies similaires (Holt *et al.*, 1994).**

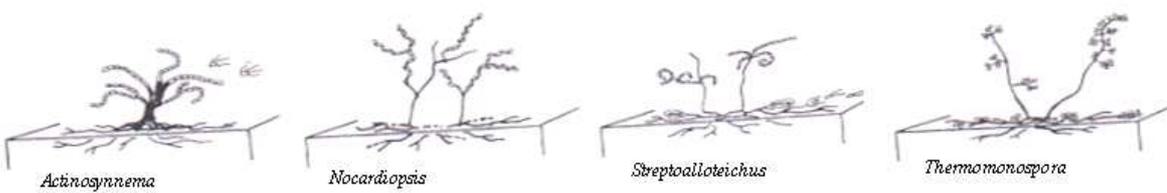
**Groupe 26**



**Groupe 26 (suite)**

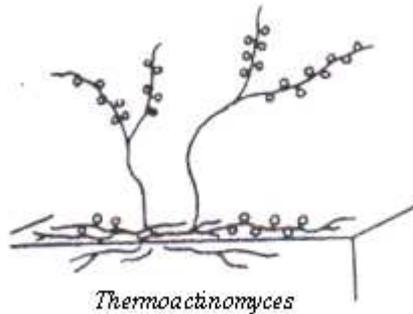


**Groupe 27**

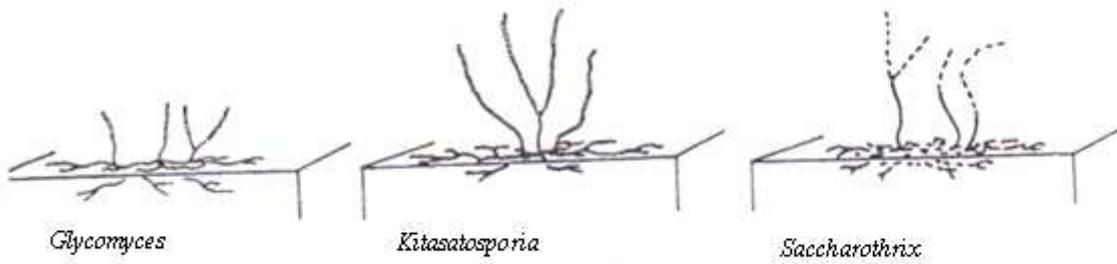


**Figure 1 (Suite):** Diagrammes schématiques des mycéliums aérien et de substrat des Actinomycetales et autres genres de morphologies similaires (Holt *et al.*, 1994).

**Groupe 28**



**Groupe 29**



**Figure 1 (Suite): Diagrammes schématiques des mycéliums aérien et de substrat des Actinomycetales et autres genres de morphologies similaires (Holt *et al.*, 1994).**

# **Matériel et Méthodes**

## 1- Prélèvement

Quatre échantillons ont été prélevés de la sebkha de Ain M'lila (photographies 1 et 2). A l'aide d'une grande spatule stérile : les cinq premiers centimètres de la couche superficielle du sol sont écartés. Cent à cent-cinquante (100 à 150) grammes de terre de la couche sous-jacente (entre 5 et 15 cm de profondeur) sont prélevés avec une petite spatule stérile, puis sont déposés sur une feuille d'aluminium. Les gros débris (pierres, racines etc....) sont écartés, et environ 50 g sont placés dans un flacon stérile et transportés le plus rapidement possible au laboratoire pour analyse (Pochon et Tardieux, 1962).

## 2- Caractéristiques physicochimique du sol des échantillons

### 2-1- Mesure du pH des échantillons

Une fois au laboratoire des suspensions de sols sont préparées (5 g de sol pour 12.5 ml d'eau distillée). Les pH sont alors mesurés à l'aide d'un pH-mètre selon la technique de Pochon et Tardieux, (1962).

### 2-2- Pourcentage d'humidité

Cinq à dix grammes de sol sont séchés pendant 2 jours dans un four à 105°C, jusqu'à obtention d'un poids constant (Lee et Hwang, 2002). Le pourcentage d'humidité

est calculé d'après la relation :  $H = \frac{PH - PS}{PH} \times 100$

H : Humidité en pourcent (%).

PH : Poids humide de l'échantillon.

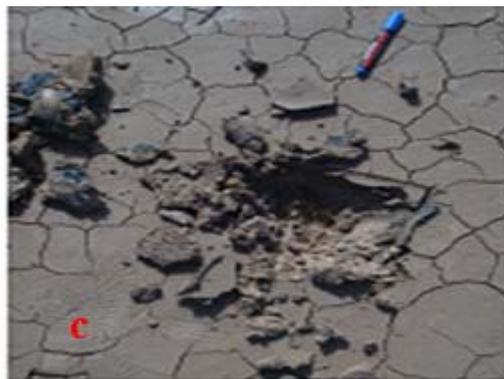
PS : Poids sec de l'échantillon.

### 2-3- Détermination du taux de la matière organique

Après mesure de l'humidité, le sol de chaque échantillon est incinéré pendant 16 heures dans un four à moufle à 450°C. Le taux de matière organique est la différence entre le poids sec et le poids des cendres (Lee et Hwang, 2002).



**Photographie n°1** : Site de prélèvement (Sebkha de Ain M'lila).



**Photographie n°2** : (a) Sol de l'échantillon n°1. (b) Sol de l'échantillon n°2. (c) Sol de l'échantillon n°4

## 2-4- Mesure de la conductivité de l'extrait aqueux 1/5

Vingt grammes (20 g) de terre tamisée dans un tamis de 2 mm sont mis en suspension dans 100 ml d'eau distillée. Après une heure d'agitation dans un agitateur rotatif suivie d'une demi-heure de repos. La suspension est ensuite décantée dans un bécher et la conductivité est mesurée à l'aide d'un conductimètre.

## 3- Prétraitements des échantillons

Quatre échantillons sont prélevés de différents endroits de la sebkha d'Ain M'Lila. Chaque échantillon a subi deux types de prétraitement :

- **Le prétraitement (T<sub>1</sub>)** Consiste à chauffer deux grammes de chaque échantillon à 50°C pendant 60 minutes (**Takizawa *et al.*, 1993**).
- **Le deuxième prétraitement (T<sub>2</sub>)** consiste à traiter 1 g de sol de chaque échantillon avec 0.1 g de **CaCO<sub>3</sub>**. Le mélange est mis dans une enceinte stérile saturée d'humidité pendant sept jours à 28°C (**El-Nakeeb et Lechevalier, 1963**).

## 4- Méthodes d'isolement

Des suspensions mères ont été préparées après avoir mis deux grammes de chaque échantillon de sol (prétraité et non prétraité) dans des tubes à essai contenant 18 ml d'eau physiologique stérile et agitées au Vortex pendant cinq minutes (**Finance *et al.*, 1986**).

L'isolement d'actinomycètes à partir de l'échantillon n°4 a été réalisé sur trois milieux différents : milieu de Bennett, milieu d'Olson et le milieu ISP5 (**Annexe 1**).

L'isolement a été réalisé sur le milieu **Bennett** additionné d'un antifongique (la **nystatine** 50 µg/l), d'un antibactérien Gram (-) (la **polymyxine** 20 µg/l) et de 12% de **NaCl**. Les dilutions 10<sup>-1</sup>, 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-3</sup> jusqu'à 10<sup>-7</sup>, préparées à partir des solutions mères de l'échantillon n°4 avec et sans prétraitement, sont ensemencées en masse, à raison de 1 ml, dans ce milieu. Les boîtes sont incubées à 28°C pendant trois semaines.

L'isolement des actinomycètes est réalisé sur le milieu **Olson**, supplémenté d'un antibactérien Gram (-) (la **polymyxine** 20 µg/l) et de 12% de **NaCl**.

Les dilutions 10<sup>-1</sup>, 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-3</sup> jusqu'à 10<sup>-7</sup>, préparées à partir de l'échantillon n°4 avec

et sans prétraitement, sont ensemencées en masse, à raison de 1 ml, dans ce deuxième milieu. Les boîtes sont incubées à 28°C pendant trois semaines.

A partir de chaque solution mère préparée des quatre échantillons (avec et sans prétraitement), les dilutions décimales  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  et  $10^{-4}$  ont été préparées. Une quantité de 1 ml de chaque dilution est ensemencée en masse (avec trois répétitions) dans des tubes contenant le milieu **ISP5** additionné de NaCl (15% de NaCl). Le mélange de chaque tube est agité au Vortex puis coulé dans des boîtes de Pétri. Ces dernières sont incubées à une température de 28°C pendant au moins 14 jours.

## **5- Observation des colonies au microscope optique**

Afin de mettre en évidence l'aspect filamenteux caractéristique des actinomycètes, l'ensemble des colonies isolées sont observées sous microscope optique (Leica DMLS) grossissement x10 (**Williams et Cross, 1971**).

## **6- Purification des souches**

Afin d'obtenir des souches pures, les différentes colonies obtenues sont repiquées et ensemencées par la méthode des stries dans des boîtes de Pétri contenant le même milieu d'isolement, puis incubées pendant 2 à 3 semaines à 28°C. Il est recommandé de réaliser le moins de repiquages possibles, pour conserver la stabilité génétique des souches.

## **7- Conservation des souches**

Seules les colonies à coloration de Gram positive présentant l'aspect filamenteux caractéristique des actinomycètes, sont conservées sur géloses inclinées du milieu ISP5 (15% de NaCl). Les tubes sont incubés à 28°C jusqu'à croissance des souches. Ils sont placés, par la suite, dans un réfrigérateur à 5°C.

## **8- Identification des souches sélectionnées**

### **8-1- Biodiversité physiologique**

#### **8-1-1- Tolérance au chlorure de sodium**

Ce test est réalisé sur le milieu ISP5 liquide additionné de NaCl pour obtenir des concentrations de (0 ; 2.5 ; 5 ; 10 ; 20 et 25%). Après ensemencement, les tubes sont incubés à 30°C en présence de tubes témoins (tube contenant le milieu de culture stérile) pendant 21 jours. Un trouble du milieu de culture témoigne de la croissance de la souche.

Pour confirmer le caractère halophile des souches actinomycètes isolées du sol de la Sebkha, ces dernières sont ensemencées dans des boîtes de Pétri contenant les milieux gélosés ISP5, Olson, GLM, et GELM en l'absence de NaCl. Les boîtes sont incubées à 30°C pendant trois semaines.

#### **8-1-2- Croissance à différentes valeurs de températures**

Les souches actinomycètes isolées du sol de la Sebkha sont ensemencées sur le milieu liquide ISP5 additionné de 10% de NaCl. Les tubes sont incubés pendant 21 jours à 20, 30, 40, 45 et 55°C en présence de tubes témoins (tube contenant le milieu de culture stérile). Un trouble du milieu de culture témoigne de la croissance de la souche.

#### **8-1-3- Croissance à différentes valeurs de pH**

Les souches actinomycétales isolées du sol de la Sebkha sont ensemencées sur le milieu de culture ISP5 additionné de 10% de NaCl préparé à différents pH (5 et 9), à raison de 3 boîtes de Pétri par souche pour chaque pH. La croissance est estimée pendant 21 jours d'incubation à 30°C.

### **8-2- Biodiversité morphologique**

#### **8-2-1- Colorations**

##### **8-1-1-1- Préparation des frottis**

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 à quatre fois sur la flamme du bec Bunsen.

### **8-1-1-2- Coloration de Gram :**

C'est un procédé qui permet de diviser les bactéries en deux groupes distincts : les bactéries à coloration de Gram positive et les bactéries à coloration de Gram négative. Cette coloration permet en plus de préciser la morphologie et le mode de groupement des cellules.

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 iodo-iodurée (le lugol) qui agit comme un mordant en augmentant les interactions entre le colorant et les cellules afin que ses dernières soient contrastées. Sans rincer et en inclinant les lames à 45°, les frottis sont décolorés par lavage avec un mélange d'éthanol et d'acétone. 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. Juste après, la décoloration est arrêtée par lavage à l'eau du robinet. Finalement, les frottis seront recolorés au moyen d'un colorant basique de couleur rose (la fuchsine de Ziehl) diluée pendant 15 secondes puis rincés abondamment à l'eau du robinet.

Une fois séchées, les lames sont examinées sous microscope optique à l'aide de l'objectif à immersion (x100).

### **8-1-1-3- Coloration de Ziehl- Neelsen (ZN)**

Les frottis sont couverts d'une solution de fuchsine phéniquée pendant 10 minutes et chauffés jusqu'à émission de vapeur trois fois successives pendant la durée de coloration, puis rincés à l'eau du robinet. Les lames sont ensuite recouvertes d'une solution d'acide sulfurique concentré diluée au ¼ pendant 3 minutes, puis rincées à l'eau du robinet. Les frottis subissent alors l'action de l'alcool éthylique à 90° pendant 5 minutes. Les lames sont alors rincées à l'eau du robinet, puis recolorées avec une solution de bleu de méthylène pendant 30 secondes à une minute suivies d'un rinçage abondant. Une fois séchées, les lames sont examinées sous microscope optique à l'aide de l'objectif à

immersion (x100).

Les cellules des mycobactéries qui sont acido-alcoolo-résistantes apparaissent colorées en rouge vif alors que celles des autres actinomycètes prennent la coloration bleue (Larpent et Larpent-Gourgaud, 1985).

#### **8-1-1-4- Coloration de Ziehl- Neelsen modifiée (ZNM)**

Les frottis sont recouverts pendant 4 à 5 minutes de fuchsine filtrée, puis rincés à l'eau du robinet. Une décoloration est ensuite réalisée à l'aide d'une solution alcoolique d'acide chlorhydrique à 1% jusqu'à l'obtention d'une coloration rose. Après rinçage à l'eau de robinet, les frottis sont recouverts avec la solution de contre-colorant bleu pendant 3 à 4 minutes suivi d'un rinçage à l'eau du robinet. En fin, après séchage, les lames sont observées sous microscope à l'objectif à immersion.

Les actinomycètes acido-alcoolo-**résistants partielles** apparaissent colorées en rose. Cette coloration met en évidence l'acido-alcoolo-**résistance** partielle des *Nocardia* et genres apparentés.

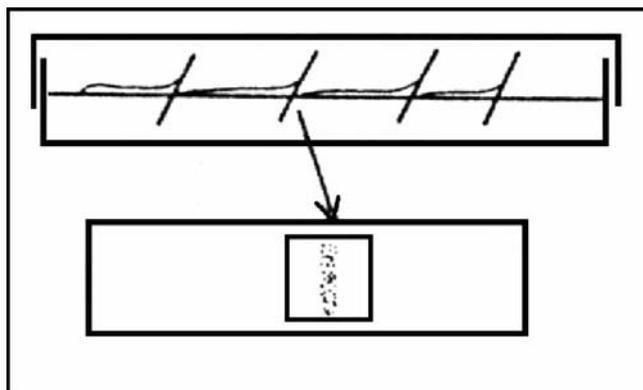
#### **8-1-1-5- Coloration de Kinyoun modifiée (KM) (Georg *et al.*, 1961)**

Les frottis sont recouverts pendant 5 minutes de fuchsine filtrée puis rincés à l'eau du robinet. Les lames sont ensuite recouvertes d'un mélange acide-alcool dilué au ¼ pendant 3 minutes. Après un rinçage à l'eau du robinet, elles seront de nouveau recolorées par le bleu de méthylène à 0.3% pendant 2 minutes. Enfin, les lames seront rincées à l'eau du robinet et séchées pour être observées à l'objectif à immersion.

Cette coloration met en évidence l'acido-alcoolo-résistance partielle des *Nocardia* et genres apparentés d'une part. D'autre part, elle permet de distinguer les *Streptomyces* des autres actinomycètes non acido-alcoolo-résistantes (Mc Neil et Brown, 1994).

### 8-2-2- Morphologie des mycéliums aériens et de substrat (Technique de culture sur lamelle)

Cette technique consiste à insérer délicatement une lamelle stérile dans le milieu gélosé ISP5 contenant 15% de NaCl de telle sorte qu'elle forme un angle de 45° avec la surface de celui-ci (**Figure 2**). Une goutte de l'inoculum est déposée contre la lamelle en contact avec le milieu.



**Figure 2 :** Technique de culture sur lamelle

Après 14 jours d'incubation à 30°C, la lamelle est retirée soigneusement de la gélose, entraînant avec elle des mycéliums de substrat et aérien non dénaturés. Elle est ensuite déposée sur une lame contenant une goutte de bleu coton ou lactophénol puis examinée au microscope optique (G x40 et x100). Des photographies ont été prises à l'aide d'un appareil photos numérique SONY 7,2 méga pixels.

La forme des filaments du mycélium aérien peut être également observée sous microscope optique (G x10) autour des colonies (**Williams et Cross, 1971**)

## 8-3- Biodiversité métabolique

### 9-3-1- Production des pigments mélanoïdes

Les pigments mélanoïdes sont des pigments bruns diffusibles. Leur mise en évidence est réalisée en cultivant les souches actinomycètes sur le milieu ISP7. Les résultats sont appréciés après 21 jours d'incubation en comparaison avec les milieux témoins non ensemencés, mais incubés dans les mêmes conditions.

### **9-3-2- 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 21 jours d'incubation à 30°C, la gélose est recouverte d'une solution de lugol. L'hydrolyse est ainsi mise en évidence par l'absence de coloration autour des colonies. À l'inverse, les zones contenant de l'amidon se colorent en brun.

### **9-3-3- Hydrolyse de la gélatine :**

Les souches sont ensemencées dans des tubes contenant de la gélatine nutritive, puis incubées à 30°C pendant 21 jours. Ensuite, les tubes sont placés pendant 1 heure environ au réfrigérateur. Si la gélatine devient solide, cela implique qu'elle n'a pas été attaquée, si elle reste liquide, une enzyme extracellulaire, la gélatinase, l'a hydrolysée (Larpen et Larpen-Gourgaud, 1985).

### **9-3-4- Hydrolyse de la caséine :**

L'hydrolyse de la caséine est étudiée selon la méthode de Gordon et Smith (1953) et Williams et Cross (1971) sur un milieu gélosé contenant 5% de lait écrémé. Après 21 jours d'incubation à 30°C, l'apparition de toute zone claire autour des colonies témoigne de l'hydrolyse de la caséine.

### **9-3-5- Action sur le lait écrémé :**

Des tubes contenant une solution de lait écrémé en poudre à 10% dans l'eau distillée sont ensemencés et incubés à 30°C. Des observations régulières pendant 14 jours permettent de noter la coagulation ou la peptonisation du lait provoquée par les souches (Williams et Cross, 1971).

# **Résultats et Discussions**

## 1/- Caractéristiques physicochimiques des échantillons

Les propriétés physicochimiques des quatre échantillons prélevés (pH, pourcentage d'humidité, conductivité et taux de matière organique) sont résumées dans le tableau suivant :

**Tableau n°2** : Paramètres physicochimiques des quatre échantillons de sol de la Sebka

Échantillons	pH	Taux d'humidité	% M.O.	Conductivité (mS/cm)	Salure (még/100g)
<b>E1</b>	7.39	13.178	4.25	4.89	24.45
<b>E2</b>	7.80	3.399	12.34	12.21	61.05
<b>E3</b>	7.55	8.563	4.51	11.47	57.35
<b>E4</b>	7.68	9.244	0.66	65.5	327.5

% M.O. : Pourcentage de la matière organique, mS : milli Siemens (unité)

Il est intéressant de noter que l'ensemble des échantillons examinés représentent des écosystèmes extrêmes par la présence très réduite de végétation et un taux de salinité très élevé. Ces échantillons se caractérisent par des valeurs de pH allant de 7.39 à 7.80. Les échantillons 1 et 3 dont les pH respectifs sont 7.39 et 7.55, sont des sols neutres, alors que les échantillons 2 et 4. dont les pH respectifs sont 7.8 et 7.68. sont des sols qui tendent vers l'alcalinité.

Selon **Lee et Hwang (2002)** le taux d'humidité d'un sol est considéré comme : faible si le pourcentage d'humidité est compris entre (2.0 et 9.0) ; modéré dans le cas où le pourcentage d'humidité varie de 9.1 à 13.0 et élevé si les valeurs sont comprises entre 13.1 et 20.0. Les résultats présentés dans le tableau 2 nous permettent de conclure que les échantillons 2 et 3 sont des sols caractérisés par des taux d'humidité faibles (compris entre 2.0% et 9.0%), tandis que l'échantillon 4 est modéré (% d'humidité compris entre 9.1% et 13.0%), alors que celui de l'échantillon 1 est considéré comme élevés (taux d'humidité compris entre 13.1% et 20.0%).

Le taux de matière organique (%) dans un sol est considéré comme : faible (4.0-7.0) ; modéré (7.1-9.0) et élevé (9.1-11.0) d'après **Lee et Hwang (2002)**. Les échantillons 1 et 3 ont des taux faibles en matière organique (compris entre 4.0 et 7.0), contrairement à l'échantillon 2 qui a un taux très élevé de matière organique (> 11.0). Le taux très bas de la matière organique de l'échantillon 4 (0.66%) nous permet de conclure que la matière

organique dans cet échantillon n'existe que sous forme de traces.

**Tableau n°3 :** Type de sol en fonction de la salure et de la conductivité électrique (**Richards, 1969**).

	Types de sol				
	Non salé	Peu salé	Salé	Très salé	Extrêmement salé
C. ex 1/5 (mS/cm)	< 0.6	0.6 - 1.2	1.2 - 2.4	2.4 - 6	> 6
Salure (még/100 g de sol)	< 3	3 - 6	6 - 12	12 - 30	> 30

C. ex 1/5 (Ms/cm) conductivité de l'extrait aqueux 1/5<sup>ème</sup>; mS : milli Siemens

En se basant sur les résultats de la conductivité présentés dans le tableau 2 et d'après l'échelle de salure qui en fonction de la conductivité électrique de l'extrait aqueux 1/5<sup>ème</sup>, présentés dans le tableau 3, nous avons pu classer l'échantillon 1, dont la conductivité est comprise entre 2.4 mS/cm et 6 mS/cm, comme un sol très salé, et que les sols des échantillons 2, 3, et 4 sont des sols extrêmement salés vu que leur conductivité est nettement supérieure à 6mS/cm. Ces trois échantillons, bien qu'ils soient regroupés dans la même classe, ont des salures très différentes. La salure de l'échantillon 4 est de loin la plus élevée. Ces résultats font de ces quatre échantillons des écosystèmes extrêmes.

## 2/- Résultats de l'isolement des actinomycètes

Au bout de 7 jours d'incubation à 28°C, les actinomycètes apparaissent et se développent lentement. Les colonies sont repérées d'après leur aspect caractéristique et sont purifiées. La recherche des bactéries actinomycétales, réalisée à partir des quatre échantillons traités ou non, sur les trois milieux de culture Bennett (additionné d'un antifongique (la nystatine 50 µg/l), d'un antibactérien anti-Gram négatifs (la polymyxine 20 µg/l) et de 12% de NaCl), Olson (supplémenté d'un antibactérien Gram (-) (la polymyxine 20 µg/l) et 12% de NaCl) et ISP5 additionné de 15% de NaCl a conduit aux résultats présentés dans les **tableaux 4 et 5**.

Le tableau 4 montre que les deux milieux (Bennett et Olson) n'ont pas permis d'isoler des actinomycètes à partir de l'échantillon 4 au contraire du milieu ISP5 qui nous a permis d'avoir 0.13% d'actinomycètes de la flore bactérienne totale isolée.

**Tableau n°4** : Résultats de l'isolement des actinomycètes à partir de l'échantillon 4.

Milieu de culture	Bactéries en UFC x 10 <sup>2</sup>	Champignons en UFC x 10 <sup>2</sup>	Actinomycètes halophiles et halotolérants en UFC x 10 <sup>2</sup>	Pourcentage des actinomycètes
Bennett	0	0	0	0
Olson	0	0	0	0
ISP5	<b>75.6</b>	<b>0.2</b>	<b>0.1</b>	<b>0.13</b>

D'après les résultats de l'isolement des actinomycètes à partir des quatre échantillons présentés dans le tableau 5 nous pouvons conclure que les isolats obtenus sont soit des halophiles soit des halotolérants. Ceci est dû au fait qu'ils ont pu croître sur le milieu d'isolement qui contenait 15% de NaCl. Ils sont dénombrés puis purifiés aux fins de conservation. Le nombre total d'actinomycètes isolés des quatre échantillons de la Sebka est de 63 colonies actinomycètes, ce qui correspond à 6.95 x 10<sup>2</sup> UFC par gramme de sol.

**Tableau n°5** : Résultats de l'isolement à partir des quatre échantillons sur ISP5 contenant 15% de NaCl

Échantillon	Bactéries en UFC x 10 <sup>2</sup>	Champignons en UFC x 10 <sup>2</sup>	Actinomycètes halophiles et halotolérants en UFC x 10 <sup>2</sup>	Pourcentage des actinomycètes
<b>E1T<sub>0</sub></b>	1.00	0.90	0.00	<b>0.00</b>
<b>E1T<sub>1</sub></b>	3.45	1.18	0.00	
<b>E1T<sub>2</sub></b>	8.00	0.45	0.00	
<b>Total</b>	12.45	2.52	0.00	
<b>E2T<sub>0</sub></b>	49.77	5.40	0.00	<b>4.40</b>
<b>E2T<sub>1</sub></b>	Indénombrables	0.20	0.00	
<b>E2T<sub>2</sub></b>	50.0	4.43	4.40	
<b>Total</b>	99.77	10.02	4.40	
<b>E3T<sub>0</sub></b>	125.00	8.33	0.10	<b>1.50</b>
<b>E3T<sub>1</sub></b>	Indénombrables	Recouvre la boîte	0.00	
<b>E3T<sub>2</sub></b>	36.25	1.00	2.35	
<b>Total</b>	161.25	9.33	2.45	
<b>E4T<sub>0</sub></b>	Indénombrables	0.00	0.00	<b>0.13</b>
<b>E4T<sub>1</sub></b>	0.1	0.10	0.10	
<b>E4T<sub>2</sub></b>	75.5	0.00	0.00	
<b>Total</b>	75.6	0.10	0.10	

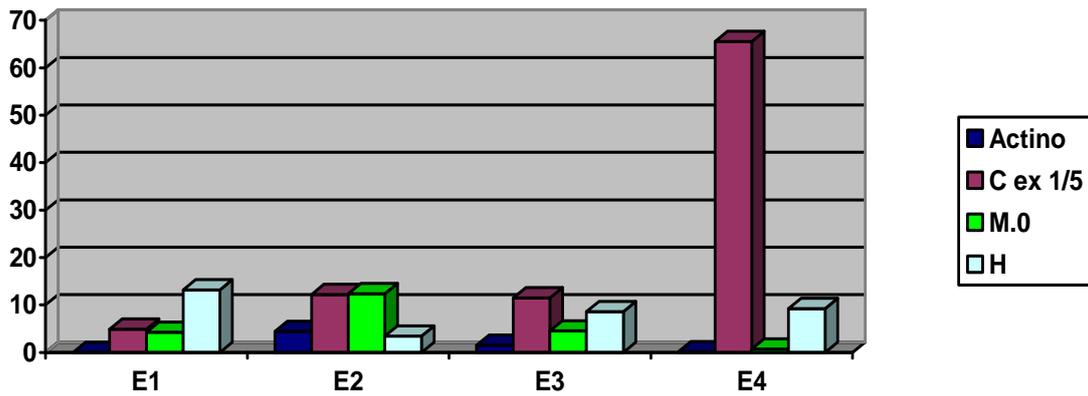
Le nombre d'actinomycètes isolés des échantillons traités par le CaCO<sub>3</sub> est de loin le plus élevé. Il est de 6.75 x 10<sup>2</sup> UFC/gramme de sol, contre 0.1 x 10<sup>2</sup> UFC/gramme de sol traité par séchage à 50°C pendant 30 minutes et 0.1 x 10<sup>2</sup> UFC/gramme de sol non traité.

Le traitement au  $\text{CaCO}_3$  est de ce fait plus efficace pour l'isolement des actinomycètes, vue qu'il permet non seulement d'obtenir le plus grand nombre d'actinomycètes, mais aussi un faible nombre de bactéries et de champignons par rapport à leurs nombres respectifs obtenus sans prétraitement. Par exemple, le nombre de bactéries isolées de l'échantillon 3 est de  $36.25 \times 10^2$  UFC/ gramme de sol traité au  $\text{CaCO}_3$  contre  $125 \times 10^2$  UFC/gramme de sol non traité. La même constatation peut être faite en ce qui concerne le nombre total des champignons isolés du même échantillon  $1 \times 10^2$  UFC/ gramme de sol traité au  $\text{CaCO}_3$  contre  $8.33 \times 10^2$  UFC/gramme de sol non traité. Ce résultat est en parfaite concordance avec celui obtenu par **El-Nakeeb et Lechevalier (1963)**.

Selon les résultats présentés dans le tableau 5, il apparaît également que le nombre d'actinomycètes isolés de l'échantillon 2 est nettement supérieur à celui obtenu à partir des échantillons 3 et 4. Il est de  $4.4 \times 10^2$  UFC/grammes de sol de l'échantillon 2 contre  $2.45 \times 10^2$  UFC/grammes de sol de l'échantillon 3 et  $0.1 \times 10^2$  UFC/grammes de sol de l'échantillon 4. Ceci peut s'expliquer par le fait que d'une part l'échantillon 2 est plus riche en matière organique que l'échantillon 3 ou 4, bien que le degré de salinité de l'échantillon 3 soit inférieur à celui de l'échantillon 2. Ceci est corroboré par la bibliographie des actinomycètes qui affirme que le nombre des actinomycètes est corrélé positivement avec le taux de la matière organique quelque soit le taux de la salinité du sol (**Lee et Hwang, 2002**).

Il est aussi important de noter qu'aucun actinomycète n'a été isolé de l'échantillon n°1 bien que la salure de celui-ci fût la plus faible par rapport aux autres échantillons. Ceci peut être dû au fait que la concentration à 15% de NaCl ajoutée au milieu d'isolement était trop élevée et par voie de conséquence défavorise la croissance des actinomycètes de cet échantillon.

Le plus grand nombre d'actinomycètes a été isolé à partir de l'échantillon 2 et à un moindre degré de l'échantillon 3 bien que leurs taux d'humidité soient considérés comme faibles (**Figure 4**). En fait, le nombre d'actinomycète isolés est inversement proportionnel au taux d'humidité des échantillons (**Sykes et Skinner, 1973 ; Basilio, 2003**).



**Figure 4 :** Fluctuation du taux d’actinomycètes isolés en fonction de la conductivité, du taux de matière organique et du taux d’humidité.

A partir des 63 souches actinomycètes isolées et purifiées, nous avons sélectionné 27 souches sur la base de leurs caractères morphologiques, pour la poursuite de notre travail. Les souches sélectionnées sont regroupées dans le tableau 6.

**Tableau n°6 :** Nombre de colonies d’actinomycètes sélectionnées par échantillon.

Échantillon	Isolat	Total des isolats
E2T <sub>2</sub>	SS21, SS22, SS23, SS24, SS25, SS28, SS29, SS210, SS211, SS212, SS214, SS215, SS216, SS220, SS222, SS227, SS2A, SS2JIM, SS2KHA, SS2HA, SS213, SS217, SS219, SS223, SS228	25
E3T <sub>0</sub>	SS32	1
E4T <sub>1</sub>	SS4K	1

### 3/-Biodiversité physiologique

#### 3-1/- Tolérance au chlorure de sodium

Les résultats de ce test sont présentés dans le tableau n°7.

**Tableau n°7** : Test de croissance des souches actinomycètes sur le milieu ISP5 et à différentes concentrations de NaCl

Souches	Concentrations de NaCl					
	0%	2.5%	5%	10%	20%	25%
SS32	-	++	+	+++Pigment	+++	-
SS4K	-	++	++	+++	+++	-
SS2A	-	+	+++	+++	+++	-
SS2JIM	-	+	+	+++	+++	+++
SS2KHA	-	+	+++	+++	+++Pigment	-
SS2HA	-	-	+++	+++	+++	++
SS21	+++	+++	+++	+++	+++	++
SS22	+	+++	+++	+++	++	-
SS23	+++	+++	+	+++Pigment	+++	-
SS24	+	+++	+++	+++	+++	-
SS25	+	+	+	+++	++	-
SS28	++	+++	+++	+++	+++	+++
SS29	+++	++	++	+	++	-
SS210	+	+++	+++	+++	+++	+++
SS211	+++	+++	+++	+++	+++Pigment	-
SS212	+++	+++	+++	+++	+++	-
SS213	-	+++	+++	+++	+++	-
SS214	+	+++	++	++Pigment	+++	-
SS215	+	+++	+++	+++	+++	++
SS216	+++	+++	+++	+++	+++	-
SS217	-	-	++	+++	+++	-
SS219	-	+++	+++	+++	+++	-
SS220	+++	+++	++	+++	+++	-
SS222	++	++	+++	+++	+++Pigment	+++
SS223	-	+	+++	+++	+++	+++
SS227	+++	+++Pigment	+++	+++Pigment	+++	-
SS228	-	+++	+++	+++	+++	+

(-) pas de croissance, (+) croissance faible, (++) croissance modéré, (+++) croissance abondante.

Sur la base de la définition des bactéries halophiles et halotolérantes apportées dans la partie bibliographique (Yoshida, 1991), nous avons pu répartir les souches d'actinomycètes isolées du sol de la Sebkhha de Ain M'Lila en deux grands groupes.

Le premier groupe est composé de 11 souches qui exigent la présence de NaCl pour leur croissance. Ce qui correspond à 40.7% de l'ensemble des actinomycètes isolés. Ce

sont des actinomycètes halophiles. Il s'agit des souches : SS4K, SS32, SS2A, SS2JIM, SS2KHA, SS2HA, SS213, SS217, SS219, SS223 et SS228.

Elles exigent au moins une concentration de NaCl supérieure ou égale à 2.5%, à l'exception de SS217 et SS2HA qui nécessitent au moins 5% de NaCl pour croître. Seules les souches SS2JIM, SS2HA, SS223 et SS228 sont capables de pousser sur le milieu ISP5 à concentration de NaCl saturante (25%). Les autres souches sont capables de se développer sur le même milieu mais dont la concentration de NaCl est de 20%.

Le second groupe est composé de 16 souches actinomycètes qui n'exigent pas la présence de NaCl dans leur milieu pour croître. Ce sont des actinomycètes halotolérantes dont cinq souches sont halotolérantes extrêmes, du fait qu'elles croissent sur le milieu ISP5 à concentration saturante de NaCl (25%). Il s'agit des souches SS21, SS28, SS210, SS215 et SS222. Toutes les autres souches sont halotolérantes modérées : aptes à tolérer une concentration de 20% de NaCl dans leur milieu de culture. Ce second groupe représente 59.3% de l'ensemble des actinomycètes isolés. Tous ces résultats sont résumés dans le tableau 8.

Il faut noter que nous avons également remarqué la production de pigments par certaines souches qui étaient auparavant non productrice de pigments sur le milieu gélosé ISP5 supplémenté de 15% de NaCl. Cette nouvelle production a été observée sur milieu liquide ISP5 supplémenté d'une concentration précise de NaCl. Il s'agit des concentrations 2.5% et 10% pour la souche SS227 de la concentration 10% pour les souches SS32, SS23 et SS214 et la concentration 20% pour les souches SS2KHA, SS211 et SS222.

**Tableau n°8** : Actinomycètes halophiles et halotolérants croissants à saturation de NaCl

Nombre	Actinomycètes halophiles	Actinomycètes halotolérants
	11	16
Pourcentage	40.7%	59.3%
Souches	SS4K, SS32, SS2A, SS2JIM, SS2KHA, SS2HA, SS213, SS217, SS219, SS223, SS228	SS21, SS22, SS23, SS24, SS25, SS28, SS29, SS210, SS211, SS212, SS214, SS215, SS216, SS220, SS222, SS227
Croissance à 25% de NaCl (Saturation)	SS2JIM, SS2HA, SS223, SS228	SS21, SS28, SS210, SS215, SS222

Pour confirmer les résultats d'halophilie, toutes les souches isolées ont été ensemencées sur quatre milieux sans NaCl : ISP5, Olson, GELM, et GLM. Les résultats obtenus ont confirmé les résultats précédents. Ils sont mentionnés dans le tableau 9.

A partir de ces résultats, il apparaît également que la plupart des souches halotolérantes trouvent les milieux ISP5 et Olson plus favorables à leur croissance que les deux autres milieux GELM et GLM.

**Tableau n°9** : Test de croissance des souches actinomycètes isolées du sol de la Sebkhia sur les milieux ISP5, Olson, GELM et GLM.

Souches	ISP5	Olson	GELM	GLM
SS32	-	-	-	-
SS4K	-	-	-	-
SS2A	-	-	-	-
SS2JIM	-	-	-	-
SS2KHA	-	-	-	-
SS2HA	-	-	-	-
SS21	+++	+++	+	+
SS22	+++	+++	-	+
SS23	+++	+	+	+
SS24	-	+	-	-
SS25	-	++	-	-
SS28	-	++	-	-
SS29	-	+++	-	-
SS210	+	-	-	+
SS211	++	+++	-	-
SS212	+++	+++	-	-
SS213	-	-	-	-
SS214	-	-	+	-
SS215	+	+	-	-
SS216	++	++	-	-
SS217	-	-	-	-
SS219	-	-	-	-
SS220	++	++	-	-
SS222	+	+	-	-
SS223	-	-	-	-
SS227	+	+	-	+++
SS228	-	-	-	-

(-) pas de croissance, (+) croissance faible, (++) croissance modéré, (+++) croissance abondante.

### 3-2/- Croissance à différentes valeurs de températures

Les résultats de la croissance à différentes températures des 27 actinomycètes étudiés figurent dans le tableau 10.

**Tableau n°10 :** Croissance des 27 isolats d'actinomycètes à **différentes valeurs de températures**

Souche	20°C	30°C	40°C	45°C	55°C
SS32	++	+++	++	-	-
SS4K	-	+++	++	++	++
SS2A	-	+++	-	-	-
SS2JIM	-	+++	+	+	+
SS2KHA	+++	++	+++	+++	+++
SS2HA	-	++	-	-	-
SS21	+++	+++	++	++	+++
SS22	+++	+++	++	+	-
SS23	-	+++	+++	++	+++
SS24	-	+++	+++	-	-
SS25	+	+++	+++	++	-
SS28	+++Pigment	+++	+++	+	+++
SS29	++	+++	+	+	+
SS210	++	+++	++	++	-
SS211	+++	+++	+++	+++	+++
SS212	-	+++	+	++	-
SS213	+++	+++	-	-	-
SS214	+++	+++	+++	+	+
SS215	-	+++	++	+	-
SS216	+++	+++	++	++	++
SS217	-	+++	+	-	-
SS219	-	+++	++	-	-
SS220	-	+++	++	++	-
SS222	-	+++	+++	++	++
SS223	-	+++	+++	++	++
SS227	-	+++	+++	+++	-
SS228	-	+++	-	-	-

(-) pas de croissance, (+) croissance faible, (++) croissance modéré, (+++) croissance abondante.

Selon les résultats exprimés dans ce tableau, nous avons discerné une fluctuation du nombre des actinomycètes en fonction de la température de croissance (**Figure 5**).

A l'exception des souches halophiles SS2A, SS2HA, SS213 et SS228 qui n'ont pu croître qu'à 30°C, toutes les souches actinomycètes isolées du sol de la Sebkhya de Ain M'Lila croissent dans un intervalle de température allant de 30°C à 40°C, ce qui équivaut à 88.89% de l'ensemble des souches isolées.

Douze souches ont montré une aptitude à croître à 55°C, ce qui représente 44.4% de l'ensemble des actinomycètes isolés. Sept sont aptes à croître dans un intervalle de température allant de 20°C à 55°C. Il s'agit des souches halotolérantes SS21, SS28, SS29, SS211, SS214, SS216 et de la souche halophile SS2KHA. Les cinq autres souches se développent entre 30°C et 55°C. Il s'agit des souches halophiles SS4K, SS2JIM et SS223 et halotolérantes SS23 et SS222.

Cependant, il faut noter la capacité de 19 souches actinomycètes, dont quatre sont des halophiles, à croître à 45°C, ce qui représente 70.4% des souches actinomycètes isolées.

Douze souches actinomycètes parmi les 27 isolats, dont trois sont des halophiles, sont aptes à croître à une température de 20°C, ce qui correspond à 44.4% de l'ensemble des actinomycètes isolés.

Il en ressort qu'à l'exception de la souche SS24, tous les actinomycètes halotolérants se développent dans un intervalle de température allant de 30°C à 45°C. Ce qui n'est pas le cas des actinomycètes halophiles, qui présentent un pourcentage trois fois inférieur à 45°C qu'à 30°C.

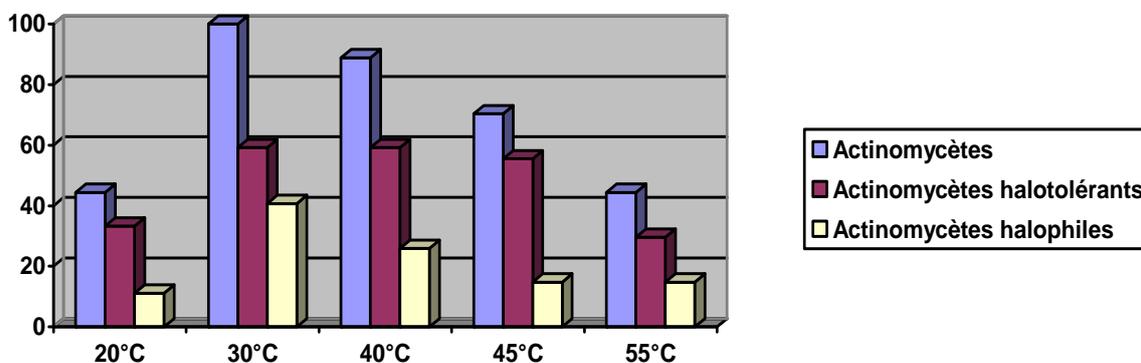


Figure 5 : Fluctuations des actinomycètes en fonction de la température.

### 3-3/- Croissance à différentes valeurs de pH

Les résultats de ce test sont représentés par le tableau 11.

**Tableau n°11** : Test de croissance des souches actinomycètes à différents de pH

Souche	pH 5	pH 7-7.4	pH 9
SS32	-	+++	+++
SS4K	+	+++	-
SS2A	+++	+++	+++
SS2JIM	+	+++	-
SS2KHA	-	+++	-
SS2HA	-	+++	-
SS21	+	+++	+++
SS22	+	+++	+++
SS23	+jaune	+++	+++marron
SS24	++jaune	+++	-
SS25	+++	+++	++
SS28	-	+++	-
SS29	+	+++	+
SS210	+	+++	+++
SS211	+	+++	++
SS212	-	+++	-
SS213	-	+++	-
SS214	-	+++	-
SS215	-	+++	-
SS216	+++	+++	-
SS217	-	+++	+++
SS219	-	+++	-
SS220	+	+++	+++
SS222	+++	+++	-
SS223	++	+++	+
SS227	-	+++	-
SS228	+	+++	+

(-) pas de croissance, (+) croissance faible, (++) croissance modéré, (+++) croissance abondante.

Selon les résultats de la croissance des actinomycètes à trois valeurs de pH (un pH acide, un pH neutre et un autre alcalin), nous divisons les souches isolées en quatre groupes :

- Le premier groupe est formé de nef souches actinomycètes neutrophiles ; qui n'ont pas poussé que sur le pH du milieu d'isolement (pH = 7-7.4). Ce groupe représente 33.3% des actinomycètes isolés et contient les souches halophiles SS2KHA, SS2HA, SS213 et SS219, ainsi que les souches halotolérantes SS28, SS212, SS214, SS215, SS226, et SS229.

- Le deuxième groupe est formé de douze souches croissant dans un intervalle de pH allant de 5 à 9, ce qui équivaut également à 44.4% des actinomycètes isolés. Ce groupe comprend : trois souches halophiles (SS223, SS228, SS2A) et neuf souches halotolérantes (SS21, SS22, SS23, SS24, SS25, SS29, SS210, SS211, SS220).
- Le troisième groupe est formé de quatre souches manifestant une croissance à pH acide. Il s'agit des souches SS4K, SS2JIM, SS216 et SS222.
- Un quatrième groupe formé de deux souches capables de croître à pH alcalin. Il s'agit des souches halophiles SS217 et SS32.

Il est bien évident que le pH de croissance des souches actinomycètes isolés du sol de la Sebka de Ain M'Lila varie de 5 à 9, ce qui est en parfaite concordance avec la bibliographie des actinomycètes.

Il est important de noter que toutes les souches qui ont pu croître sur pH 5 ou pH 9 ont changé de couleur et sont devenues de couleur blanche, à l'exception des isolats SS23 et SS24.

## **4/- Biodiversité morphologique**

### **4-1/- Examen macroscopique et microscopique des isolats**

En se basant sur la taille des colonies, nous avons pu diviser les différents isolats en trois groupes :

- Le premier groupe est formé des isolats formant des colonies de grande taille rondes et bombées comme est le cas de l'isolat SS4K, ou d'un aspect corné et sec caractérisant les isolats SS28 et SS211, ou encore bosselées comme SS216.
- Le deuxième groupe donne des colonies de taille moyenne, il représente le 1/3 des isolats et regroupe les souches SS25. SS29. SS210. SS212. SS215. SS219. SS220. SS2A, et SS2KHA.
- Le troisième groupe est composé des isolats SS32. SS21, SS22. SS214. SS217. SS223. SS227. et SS228 qui forment des colonies de petite taille.

À l'exception de quatre souches (SS28. SS211, SS214. SS216. et SS227), toutes les souches isolées sur le milieu ISP5 supplémenté de 15% de NaCl produisent un pigment diffusible sur ce milieu.

Les isolats SS4K, SS32. SS22. SS29. SS217. et SS219 produisent un pigment brun diffusible. En effet, l'intensité de la couleur du pigment varie d'une souche à une autre ; comme est le cas de la souche SS25 qui produit un pigment marron foncé diffusible, ou des souches SS2A et SS2KHA qui produisent un pigment marron miel diffusible. La production d'un pigment vert olive est observée chez les souches SS210. SS215. SS223. et SS228.

La couleur des colonies est d'une manière générale marron. Cependant, nous avons pu déceler de petites différences : Pour certaines souches, les colonies ont un centre marron et une périphérie beige. C'est le cas des souches SS4K, SS32. SS25. SS211, et SS216.

Pour les souches SS28. SS223. SS228. SS2A, et SS2KHA, la couleur est marron foncé. La couleur beige caractérise les deux isolats SS217 et SS227. Les autres souches comme SS29, SS210 et SS212, avaient une couleur intermédiaire

Grâce à l'observation des colonies sous microscope optique au grossissement (G x10). nous avons pu confirmer l'aspect filamenteux des isolats qui apparaissait tout autour des colonies d'une part, et de différencier les filaments irradiants des colonies d'autre part. Pour certaines souches, les filaments étaient très fins, comme est le cas de SS4K, SS216, SS217, SS220, SS223 et SS228. Pour d'autres, ils étaient épais ; c'est le cas des isolats SS32, SS25, SS28, SS210 et SS211 ; intermédiaire pour les souches SS21, SS22, SS29, SS214 et SS219.

Pour la souche SS4K : les colonies sont de grandes tailles, rondes et compactes, de contours réguliers, avec un centre marron et une périphérie beige. Elles produisent un pigment brun diffusible et une masse sporale blanche. Elles apparaissent sous microscope optique au grossissement (G x10) entourées de filaments très fins.

La souche SS32 pousse lentement mais abondamment. Les colonies sont petites, rondes de couleur marron avec périphérie claire. Elles ont un contour régulier et apparaissent sous microscope au grossissement (G x10) entourées de filaments épais et ramifiés. Elles produisent un pigment brun diffusible.

Pour la souche SS21 : les colonies sont petites, rondes et de couleur jaune qui vire par la suite à la couleur marron. Elles sont bombées, compactes, opaques, à contour régulier. Au grossissement (G x10). elles apparaissent entourées de filaments fins et enchevêtrés. Elles produisent un pigment jaune diffusible.

La souche SS22 pousse lentement mais abondamment. Les colonies sont petites, rondes et de couleur marron. Elles sont bombées, compactes, opaques, à contour régulier. Au grossissement (G x10). elles apparaissent entourées de filaments longs, fins et enchevêtrés. Elles produisent un pigment brun diffusible. La masse sporale est de couleur blanche.

Pour les isolats SS23 et SS24 : la pousse est lente mais abondante. Les colonies sont de taille moyenne, bombées, compactes, et de couleur marron

Les colonies de la souche SS25 sont rondes, de taille moyenne et de couleur marron qui s'éclaircit en s'éloignant du centre de la colonie. Elles ont un contour régulier et apparaissent sous microscope au grossissement (G x10) entourées de filaments épais et

ramifiés. La masse sporale est de couleur blanche. Elles produisent un pigment marron foncé diffusible.

La souche SS28 pousse lentement et faiblement. Les colonies sont grandes, d'une couleur marron foncé, bombées, d'aspects cornés et secs. Elles adhèrent fortement au milieu de culture en provoquant une dépression de celui-ci. Leur contour est irrégulier et apparaissent sous microscope optique au grossissement (G x10) entourées de filaments épais et enchevêtrés. La masse sporale est blanche.

Pour la souche SS29 : La pousse est lente mais abondante. Les colonies sont d'une taille moyenne, rondes et compactes. Elles ont une couleur marron et produisent un pigment brun diffusible. Elles ont un contour régulier, et apparaissent sous microscope optique entourées de filaments fins et courts.

Les colonies de la souche SS210 sont rondes, de taille moyenne, marron et de contour régulier. Elles apparaissent sous microscope optique au grossissement (G x10) entourées de filaments épais et ramifiés. Elles produisent une masse sporale blanchâtre et un pigment vert olive diffusible.

Pour la souche SS211 : Les colonies sont très grandes, bombées et d'aspect corné. Le centre de la colonie est d'une couleur marron foncé et la périphérie est marron claire. Leur contour est irrégulier, et apparaissent sous microscope optique au grossissement (G x10) entourées de filaments épais et courts. La masse sporale est blanche.

La souche SS212 pousse lentement mais abondamment. Les colonies sont de taille moyenne, rondes, marron avec un cercle de couleur marron tout autour. Leur contour est régulier.

La pousse de la souche SS214 est lente mais abondante. Les colonies sont petites, rondes, de couleur jaune et contour régulier. Elles apparaissent sous microscope optique au grossissement (G x10) entourées de filaments longs, fins et enchevêtrés.

Pour la souche SS215 : La pousse est lente et abondante. Les colonies sont rondes, compactes, de couleur marron et de taille moyenne. Leur contour est régulier. Elles produisent un pigment diffusible de couleur vert olive.

Les colonies de la souche SS216 sont grandes de taille, rondes, bosselées avec un centre marron et une périphérie jaune. Elles adhèrent fortement au milieu, provoquant une dépression dans celui-ci. Leur contour est régulier avec des filaments très fins tout au tour.

La souche SS217 est caractérisée par une pousse lente et abondante. Les colonies sont rondes, petites et compactes, de couleur marron clair. Leur contour est régulier. Elles apparaissent sous microscope optique au grossissement (G x10) entourées de filaments très fins. Elles produisent un pigment brun diffusible.

Pour la souche SS219 : Les colonies sont de couleur marron, de taille moyenne, compactes, et peu opaques. Elles apparaissent sous microscope optique au grossissement (G x10) entourées de filaments fins et courts. Elles produisent un pigment brun diffusible.

Les colonies de la souche SS220 sont rondes, de taille moyenne et de couleur marron. Leur contour est régulier et apparaissent sous microscope optique au grossissement (G x10) entourées de filaments très fins. Elles produisent un pigment brun diffusible. La masse sporale est blanche.

Pour la souche SS223 : La pousse est lente mais abondante. Les colonies sont de couleur marron très foncé. Elles sont petites de taille, rondes, compactes, avec un contour régulier. Elles produisent un pigment vert olive diffusible, et apparaissent sous microscope optique au grossissement (G x10) entourées de filaments très fins et longs.

Les colonies de la souche SS227 sont rondes, compactes et petites, d'une couleur marron clair. Elles ne produisent pas de pigment. Leur contour est régulier, et apparaissent sous microscope optique au grossissement (G x10) entourées de filaments très fins.

L'isolat SS228 se caractérise par une pousse lente mais abondante. Les colonies sont petites, opaques, rondes, de couleur marron foncé. Elles ont un contour irrégulier et produisent une masse sporale blanche ainsi qu'un pigment vert olive diffusible. Elles apparaissent sous microscope optique au grossissement (G x10) entourées de filaments très fins irradiants.

Les colonies des isolats SS2A et SS2KHA sont de taille moyenne, de couleur

marron foncé, compactes, adhérentes, et produisent un pigment diffusible marron miel. Elles ont un contour régulier.

Les colonies de la souche SS2HA sont grandes de taille, compactes, adhérentes, et de couleur marron. Elles produisent un pigment diffusible d'une couleur marron beige. Leur contour est régulier, et apparaissent sous microscope optique au grossissement (G x10) entourées d'un cercle de filaments enchevêtrés.

Les colonies de la souche SS2JIM sont grandes de taille, de couleur marron, compactes. Elles produisent un pigment diffusible de couleur beige et une masse sporale blanche. Leur contour est régulier.

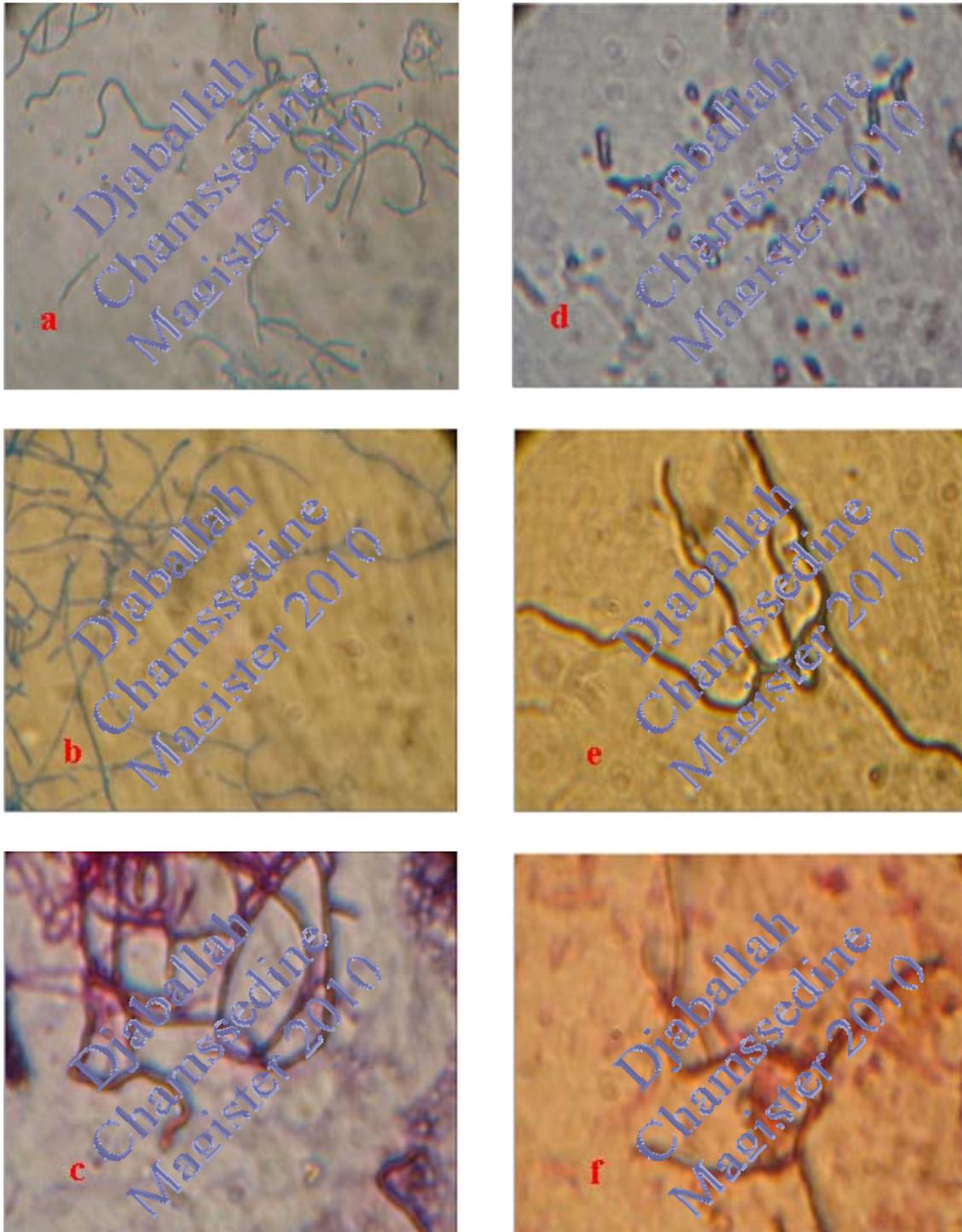
#### **4-2/- Colorations :**

Les résultats des colorations reflètent la composition chimique de la paroi des bactéries d'une manière générale et particulièrement celle des actinomycètes. Afin de distinguer et classifier les souches actinomycètes isolés, plusieurs colorations ont été réalisées : coloration de Gram, coloration de Ziehl-Neelsen (ZN), coloration de Ziehl-Neelsen modifiée (ZNM) et coloration de Kinyoun modifiée (KM). Les résultats des différentes colorations sont représentés dans le tableau n°7.

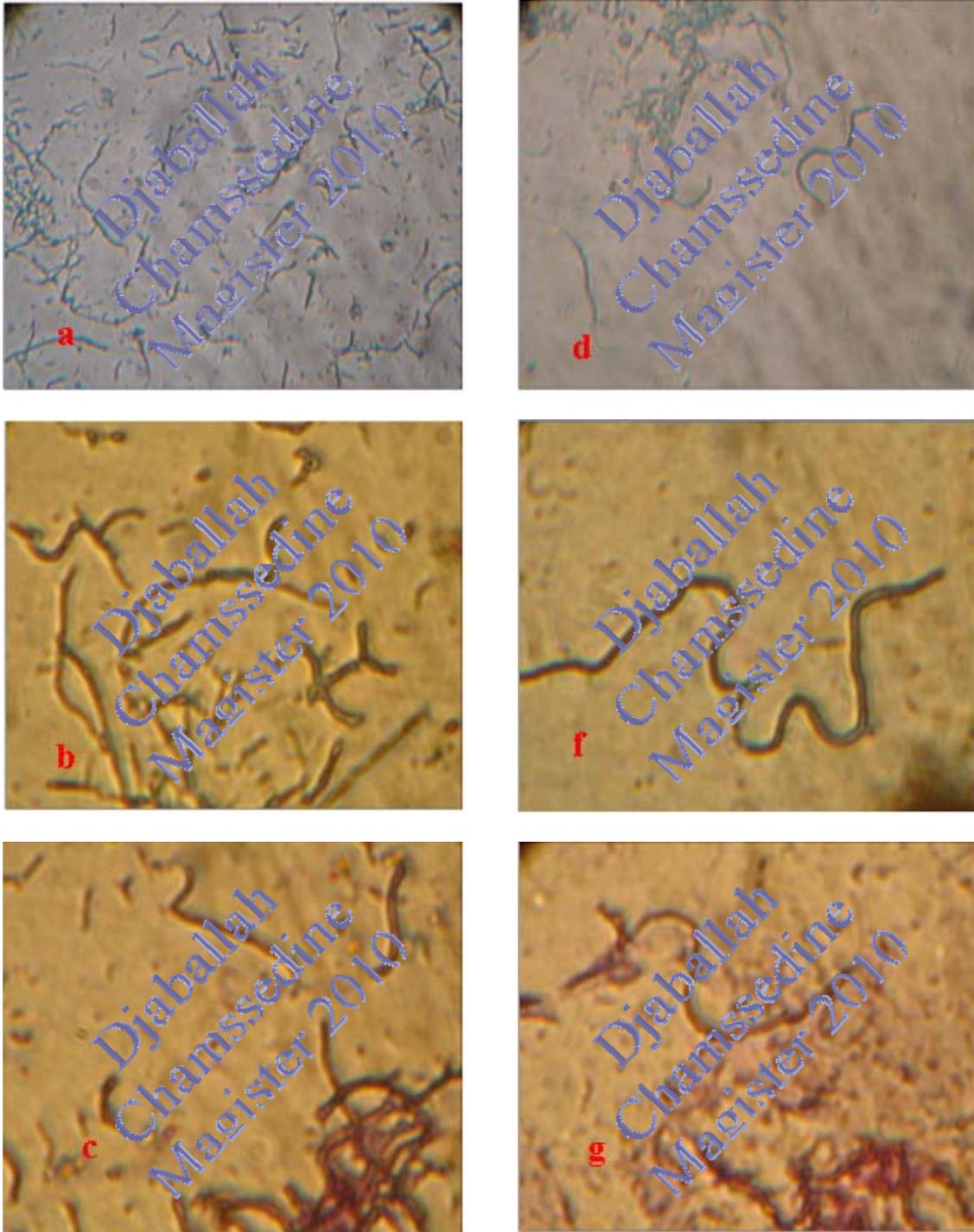
Après observation des frottis colorées au microscope optique à l'objectif à immersion (G x 100). il s'est révélé que toutes les souches actinomycètes isolées sont des bactéries filamenteuses, à coloration de Gram positive, à coloration Ziehl-Neelsen négative, à coloration de Kinyoun négative et à coloration de Kinyoun modifiée positive (Photographies n°3 et n°4). Cette faible acido-alcool-résistance laisse supposée la présence d'actinomycètes des genres filamenteux (**Mc Neil et Brown, 1994**).

**Tableau n°12 :** Résultats des colorations de Gram, de Ziehl-Neelsen, de Kinyoun, et de Kinyoun modifiée.

Souches	Colorations			
	Gram	Ziehl-Neelsen	Kinyoun	Kinyoun modifiée
SS32	+	-	-	+
SS4K	+	-	-	+
SS2A	+	-	-	+
SS2JIM	+	-	-	+
SS2KHA	+	-	-	+
SS2HA	+	-	-	+
SS21	+	-	-	+
SS22	+	-	-	+
SS23	+	-	-	+
SS24	+	-	-	+
SS25	+	-	-	+
SS28	+	-	-	+
SS29	+	-	-	+
SS210	+	-	-	+
SS211	+	-	-	+
SS212	+	-	-	+
SS213	+	-	-	+
SS214	+	-	-	+
SS215	+	-	-	+
SS216	+	-	-	+
SS217	+	-	-	+
SS219	+	-	-	+
SS220	+	-	-	+
SS222	+	-	-	+
SS223	+	-	-	+
SS227	+	-	-	+
SS228	+	-	-	+



**Photographie n°3** de la souche SS21 [ a) coloration de Ziehl-Neelsen, b) coloration de Kinyoun, c) coloration de Kinyoun modifiée], et de la souche SS24 [d) coloration de Ziehl-Neelsen, e) coloration de Kinyoun, f) coloration de Kinyoun modifiée].



**Photographies n°4** de la souche SS220 [a) coloration de Ziehl-Neelsen, b) coloration de Kinyoun, c) coloration de Kinyoun modifiée], et de la souche SS223 [d) coloration de Ziehl-Neelsen, e) coloration de Kinyoun, f) coloration de Kinyoun modifiée].

#### 4-3/- Technique des lamelles :

Les résultats de l'observation des lamelles sous microscope optique aux grossissements (G x 40 et G x 100) sont présentés dans les planches n°7, 8, 9 et 10. D'après les photographies, il en ressort que 14 isolats portent des structures particulières ; principalement des sporanges. Il s'agit des souches SS21, SS22, SS23, SS25, SS28, SS29, SS211, SS212, SS213, SS217, SS219, SS220, SS227 et SS228.

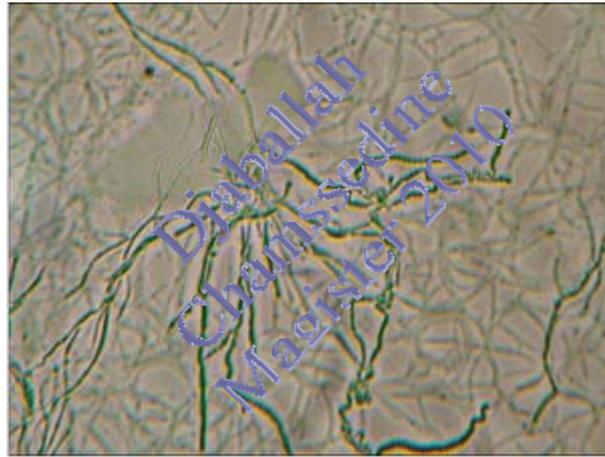
Grâce à cette technique, nous pouvons regrouper les souches actinomycètes isolées en trois catégories :

La première catégorie est formée de souches ne présentant aucune structure particulière :

- Les genres *Streptomyces*, *Saccharopolyspora* se caractérisent par la présence de longues chaînes de spores allant de trois spores à plusieurs. En plus, ces chaînes de spores ne sont pas droites. En effet, la souche SS24 est caractérisée par la présence de longues chaînes de spores contenant 24 à 38 spores (**photographie n°5**), donc elle peut être assignée à l'un de ces genres.

- La souche SS2JIM se caractérise également par la présence de très longues chaînes de spores (entre 14 et 27, jusqu'à 45 spores). Les spores sont de forme ovale à cylindrique. De plus cette souche est halophile. A cette souche s'ajoute la souche halophile SS2HA qui est caractérisée par un mycélium de substrat stables et un mycélium aérien bien développés et formant des chaînes de spores (**photographie n°6 et n°7**). La description des genres *Actinopolyspora* et *Kitasatosporia* dans le Bergey's Manual (9<sup>ème</sup> édition) mentionne leurs possession de longues chaînes de spores, ainsi que l'halophilie du genre *Actinopolyspora*. Ce qui nous permet d'assigner ces souches probablement à l'un de ces genres.

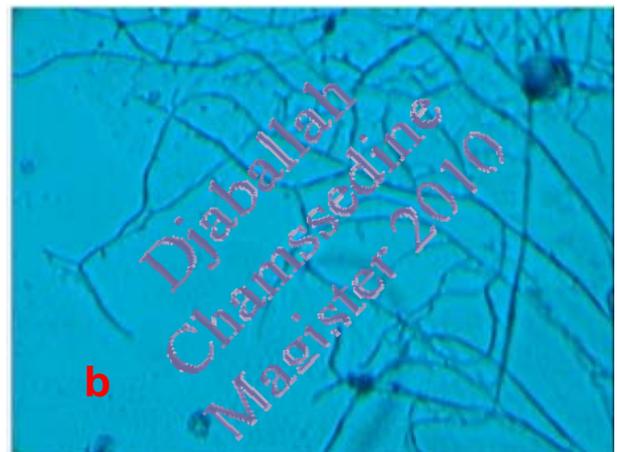
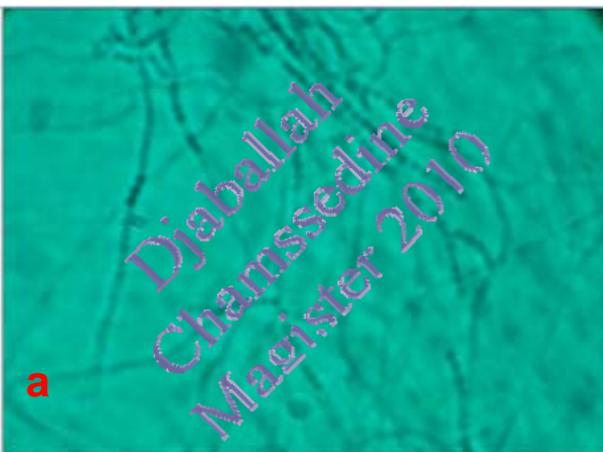
- L'observation microscopique des lamelles des souches SS210, SS215 et SS222 montre que le mycélium de substrat est de nature fragmentaire, alors que le mycélium aérien est bien développé et ramifié (**photographie n°8, n°9, et n°10**). De plus, ces souches montrent l'aptitude à croître dans des intervalles de températures allant de 20°C à 45°C pour la souche SS210, de 30°C à 45°C pour la souche SS215, et de 30°C à 55°C pour la souche SS222.



**Photographie n°5** du mycélium aérien au grossissement (G x100) de la souche SS24.



**Photographie n°6** de la souche SS2JIM. (a) mycélium aérien au grossissement (G x100), (b) mycélium de substrat au grossissement (G x 40).



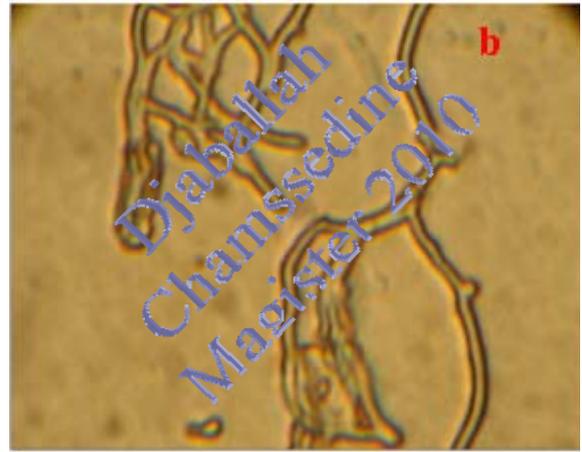
**Photographie N° 7** de la souche SS2HA. (a) : mycélium aérien au grossissement x100, (b) : mycélium de substrat au grossissement x40.

**Planche N° 3** : Photographies des mycéliums des souches SS24, SS2JIM et SS2HA.

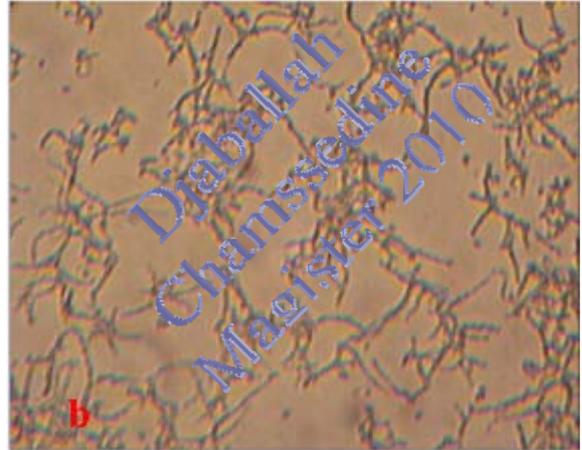
Le genre *Nocardiopsis* est décrit dans le Bergey's Manual (9<sup>ème</sup> édition) comme un genre pourvu d'un mycélium de substrat fragmentaire, un mycélium aérien bien développé, croissant dans un intervalle de température allant de 10°C à 45°C. C'est pourquoi nous pouvons assigner ce groupe de souches au genre *Nocardiopsis*.

- La souche SS214 est caractérisée par l'absence de son mycélium aérien et la stabilité de son mycélium de substrat (**photographie n°11**). Cette propriété caractérise les genres *Oerskovia* et *Jonesia*. Nous assignons cette souche à l'un de ces genres.

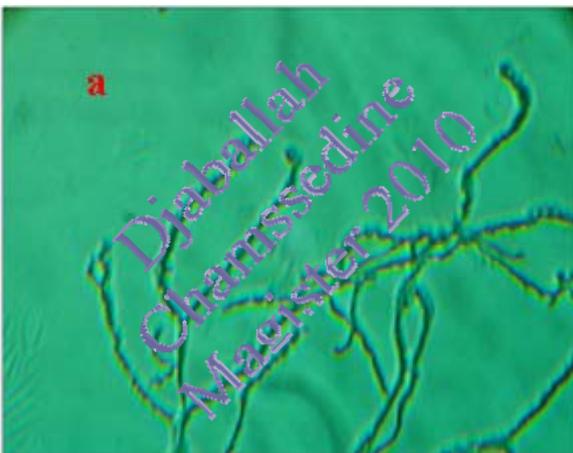
- Les isolats SS2A, SS223, SS32, SS4K, et SS2KHA : sont des souches halophiles qui possèdent un mycélium aérien formé de longs hyphes susceptibles de se fragmentés en chaînes de spores comme est le cas de la souche SS2A (photographie n°12, n°13, n°14, n°15, et n°16). Selon le Bergey's Manual (9<sup>ème</sup> édition), le genre *Actinopolyspora* est un genre halophile caractérisé par de longs chaînes de spores. De ce fait, il y a une forte possibilité que ces souches appartiennent à ce genre.



**Photographie n°8** de la souche SS210. (a) mycélium aérien au grossissement ( G x 40)  
(b) mycélium de substrat au grossissement (G x 100).



**Photographie n°9** de la souche SS215 au grossissement (G x 40). (a) mycélium aérien  
(b) mycélium de substrat.

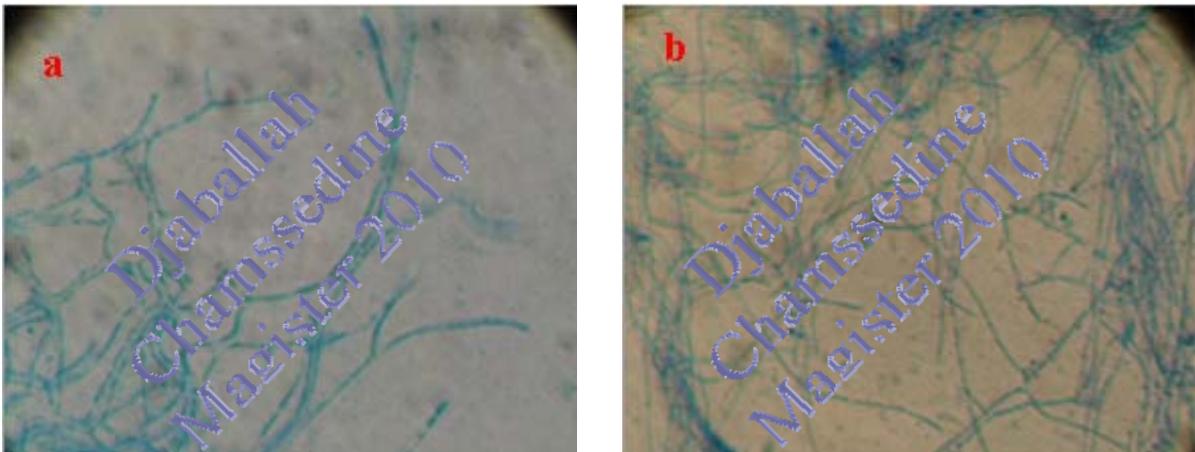


**Photographie n°10** de la souche SS222 au grossissement (G x 40). (a) mycélium aérien  
(b) mycélium de substrat.

**Planche n°4** : Photographies des mycéliums des souches SS211, SS215 et SS222.



**Photographie n°11** du mycélium de substrat au grossissement (G x100) de la souche SS214.

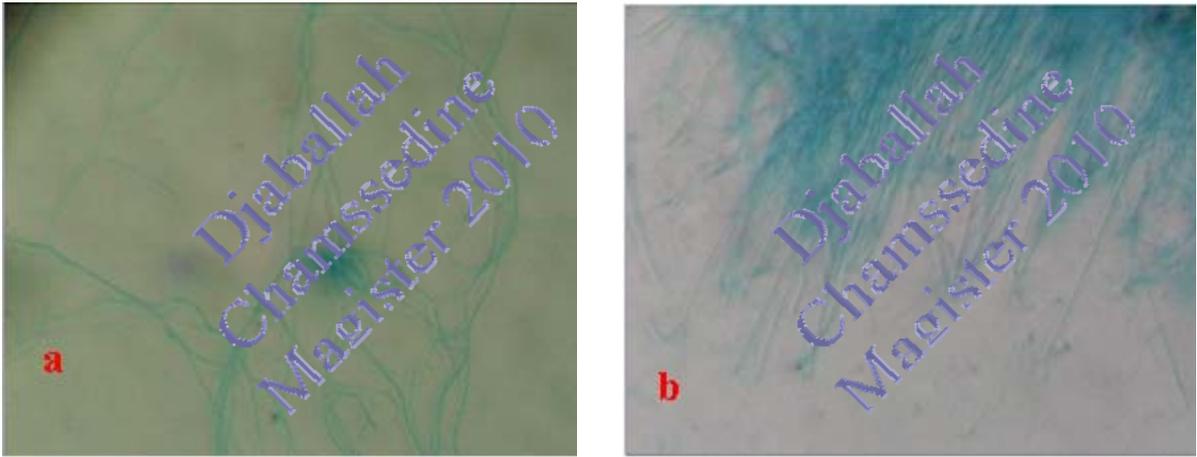


**Photographie n°12** de la souche SS2A au grossissement (G x100). (a) mycélium aérien (b) mycélium de substrat.

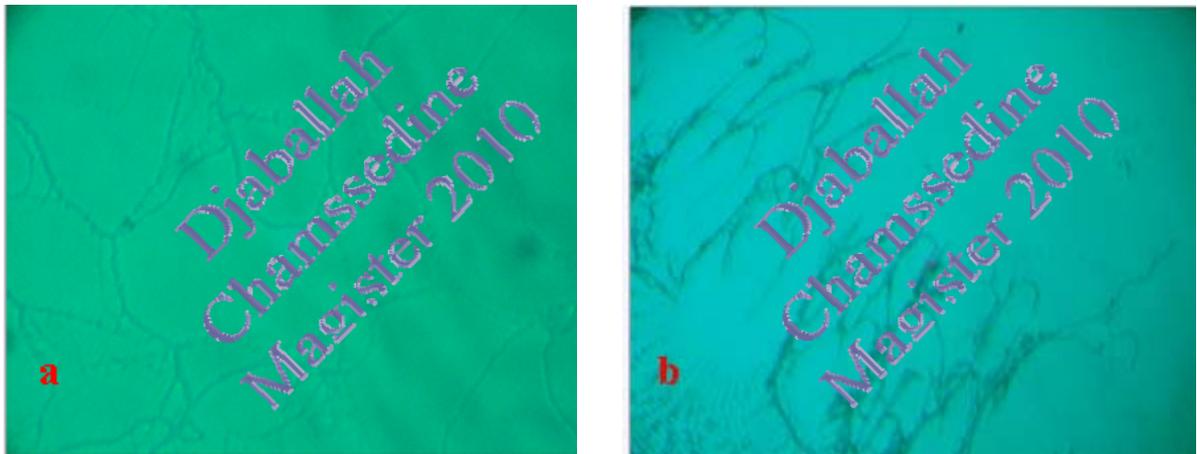


**Photographie n°13** de la souche SS223 au grossissement (G x 40). (a) mycélium aérien (b) mycélium de substrat.

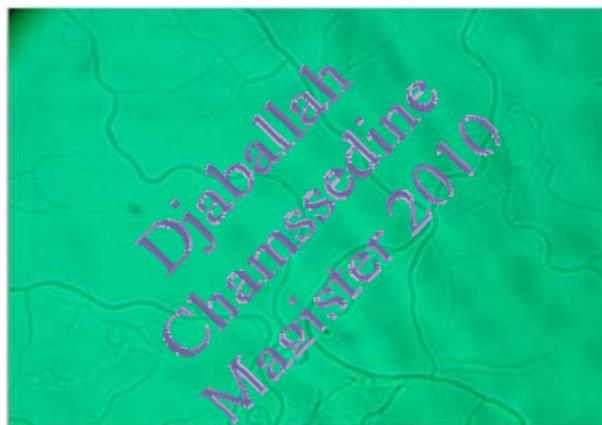
**Planche n°5** : Photographies des mycéliums des souches SS214, SS2A, et SS223.



**Photographie n°14** de la souche SS32 au grossissement (G x 100). (a) mycélium aérien  
(b) mycélium de substrat.



**Photographie n°15** de la souche SS4K au grossissement (G x 40). (a) mycélium aérien  
(b) mycélium de substrat.



**Photographie n°16** du mycélium aérien au grossissement (G x 40) de la souche SS2KHA.

**Planche n°6** : Photographies des mycéliums des isolats SS32, SS4K, et SS2KHA.

La deuxième catégorie est formée d'isolats possédants des sporanges :

- Les photographies n°17, n°18, n°19 et n°20 montrent que les isolats SS22, SS29, SS217 et SS227 se caractérisent par un mycélium de substrat bien développé et stable, à l'exception de SS22 dont le mycélium de substrat fragmentaire. Sur ce mycélium se dressent des sporangiophores portants des sporanges de forme irrégulière.

Considérant la description des genres *Actinoplanes*, *Ampullariella*, et *Pilimelia*, donnée dans le Bergey's Manual (9<sup>ème</sup> édition) d'une part et la clé d'identification des genres actinomycètes présentée dans la partie bibliographie (cf. **partie : 3-2. pages ; 17 - 24**), il apparaît que ces genres présente un mycélium aérien peu développé sur le quel se forment de nombreux groupes globuleux ou irréguliers (sporangies). Ils sont portés sur des sporophores, et contiennent de nombreuses spores. Donc, nous pouvons assigner les isolats SS22. SS29. SS217. et SS227 aux genres suscités.

- La description des genres *Streptosporangium* et *Spirillospora* dans le Bergey's Manual (9<sup>ème</sup> édition) mentionne la stabilité de leurs mycélium de substrat et le bon développement de leurs mycélium aérien qui porte des sporanges sur des sporangiophores. En plus, les espèces du genre *Spirillospora* croissent sur un intervalle de température allant de 18 à 35°C, et certaines espèces du genre *Streptosporangium* sont thermotolérantes.

Les souches SS23, SS25, SS28 et SS220 sont caractérisées par la présence de mycélium aérien ramifié portant des sporanges (**photographie n°21, 22, 23 et 24**), ainsi que par un intervalle de température allant de : 30°C à 55°C pour SS23, 20°C à 45°C pour SS25, 20°C à 55°C pour SS28, 30°C à 45°C pour SS220, ce qui nous permet d'assigner ce groupe de souches aux genres *Streptosporangium* et *Spirillospora*.

- L'observation microscopique des lamelles des souches SS21, SS211, SS212. SS213. SS228 montre un mycélium aérien qui porte de petite vésicules contenant une, deux, ou trois spores (**photographies n°25, 26, 27, 28 et 29**). Toute ces souches ont montré l'aptitude à se développer en présence de grandes concentration de NaCl (au moins 15%), à dégrader l'amidon, la gélatine, et la caséine comme est le cas de la souche SS211 et SS228. ou seulement l'amidon et la gélatine pour SS21, ou uniquement la gélatine pour les deux autres souches. En plus, ces souches poussent sur des températures allant de 20°C à 55°C pour SS21 et SS211 et entre 30°C et 45°C pour la souche SS212. entre 20°C et 30°C

pour la souches SS213 , et seulement à 30°C pour la souche SS228.

Selon le Bergey's Manual (9<sup>ème</sup> édition), le genre *Dactylosporangium* forme sur son mycélium de substrat des sporangiophores qui portent des sporanges contenant trois à quatre spores. Selon la même référence, le genre *Streptoalloteichus* forme des chaînes de spores qui varient de 5 à 50, ainsi que des vésicules englobant une à deux à quatre spores. Il dégrade la gélatine, la caséine, l'amidon, pousse entre 20°C et 54°C, et tolère 5% de NaCl. C'est pourquoi que nous pouvons assigner ce groupe de souches aux derniers genres cités.

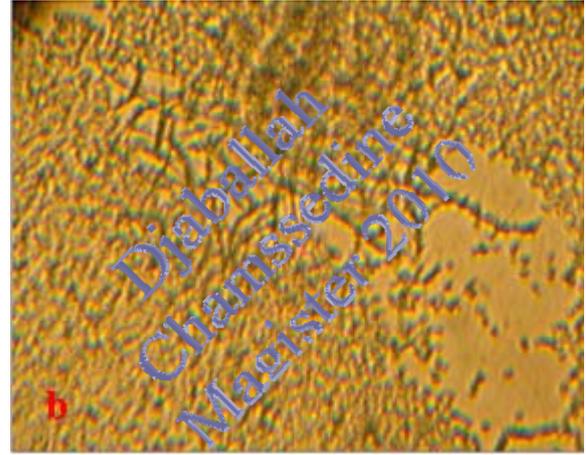
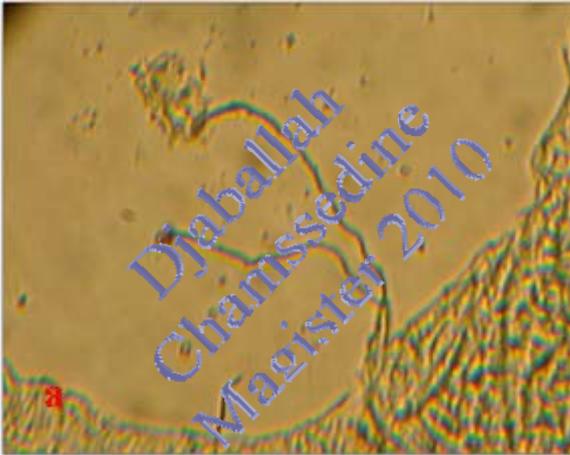
- La souche SS219 forme des sporanges intercalaires, mais le mycélium de substrat et aérien sont fragmentés (**photographie n°30**). Cette souche se développe sur un intervalle de température allant de 30°C à 40°C.

Selon la clé de détermination des principaux genres d'actinomycètes (**cf. partie : 3-2. pages ; 17-24**), le genre *Intrasporangium* forme des vésicules intercalaires et/ou aux extrémités des hyphes, en forme de limon ou ovale. Les souches de ce genre croissent sur un intervalle de température allant de 28°C à 37°C, mais pas à 45°C. C'est pourquoi nous pouvons assigner cette souche à ce genre.

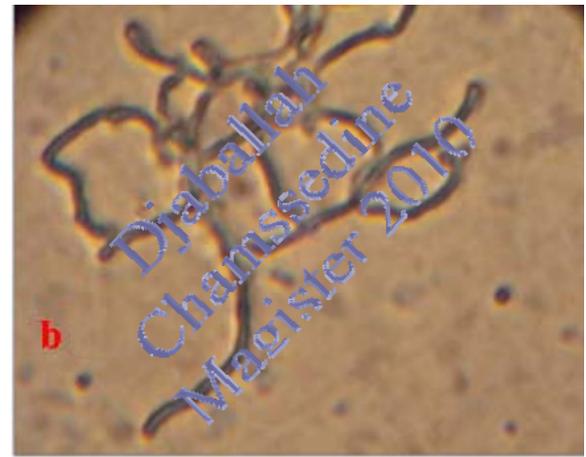
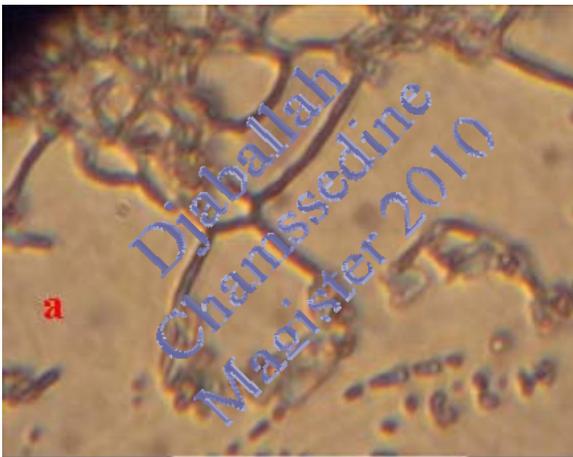
La troisième catégorie est composée d'une seule souche ayant des corémies comme structure particulière :

- La souche SS216 peut être assignée au genre *Actinosynnema*, du fait de que le mycélium aérien de cette dernière forme des corémies sur lesquelles se développent des hyphes aériens. Ces hyphes se désagrègent pour donner des spores (**photographie n°31**). Cette morphologie caractérise également le genre *Streptomyces* qui, Selon le Bergey's Manual (9<sup>ème</sup> édition), peut former des structures particulières dont les corémies ; c'est donc un deuxième genre au quel l'isolat SS216 peut être attribué.

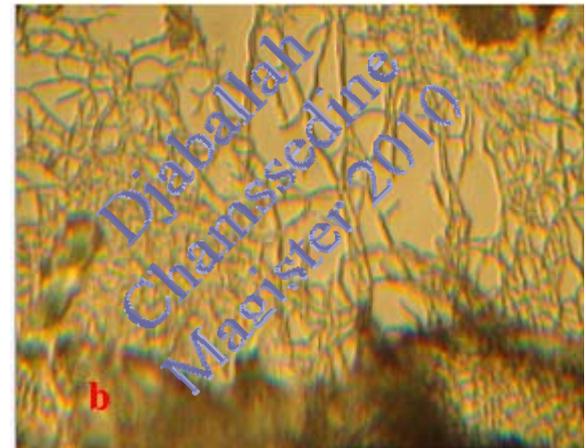
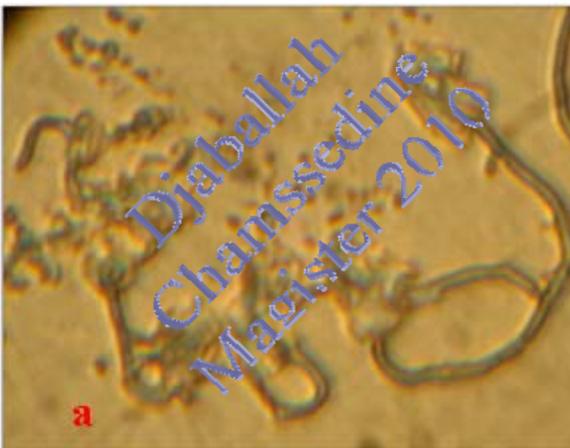
Il est très important de noter que cette assignation des souches actinomycètes aux différents genres déjà cités, n'est pas irrévocable, et que l'étude de la paroi des différentes souches, en particulier la détermination du profil des sucres et d'acides aminés par la chimiotaxonomie, est inévitable pour arriver à identifier avec précision les genres des différents isolats.



**Photographie n°17** de la souche SS22 au grossissement (G x 40). (a) mycélium aérien (b) mycélium de substrat.

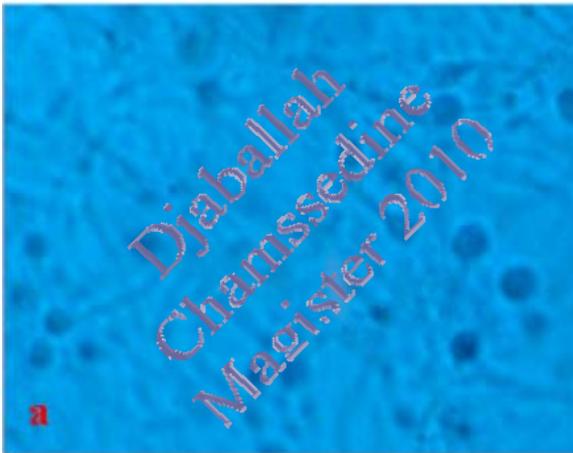


**Photographie n°18** de la souche SS29 au grossissement (G x 100). (a) mycélium aérien (b) mycélium de substrat.

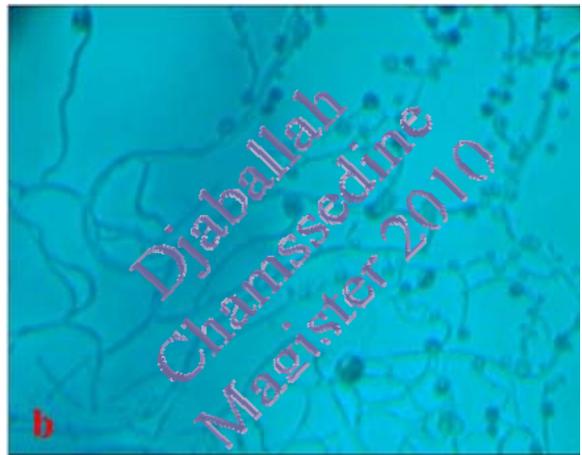
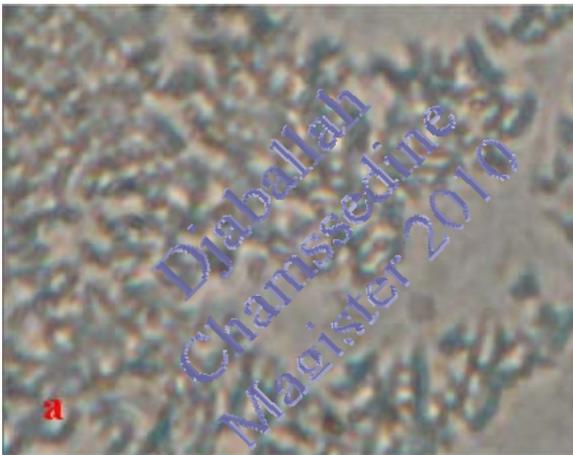


**Photographie n°19** de la souche SS217. (a) mycélium aérien au grossissement (G x 100) (b) mycélium de substrat au grossissement (G x 40).

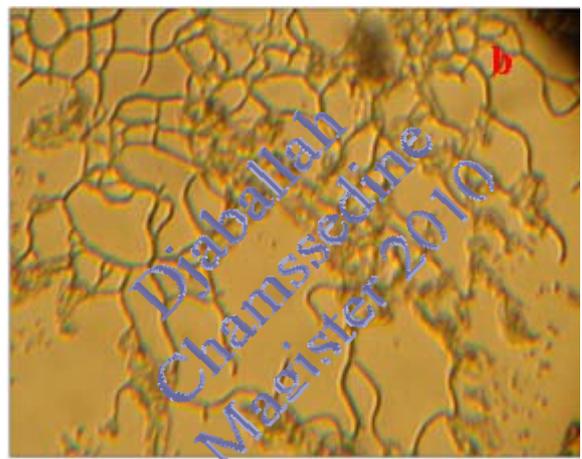
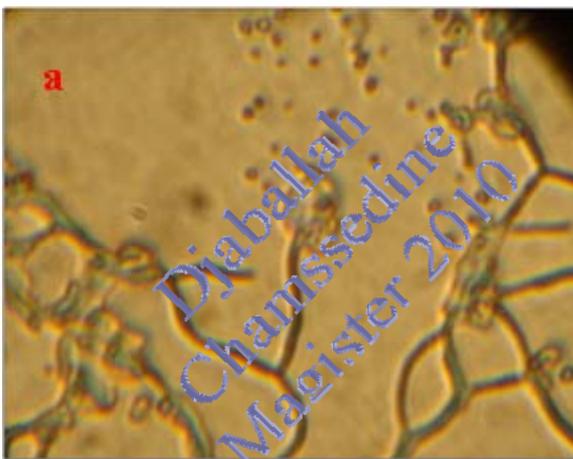
**Planche n°7** : Photographies des mycéliums des souches SS22, SS29 et SS217.



**Photographie n°20** de la souche SS227 au grossissement (G x 100). (a) mycélium aérien (b) mycélium de substrat.

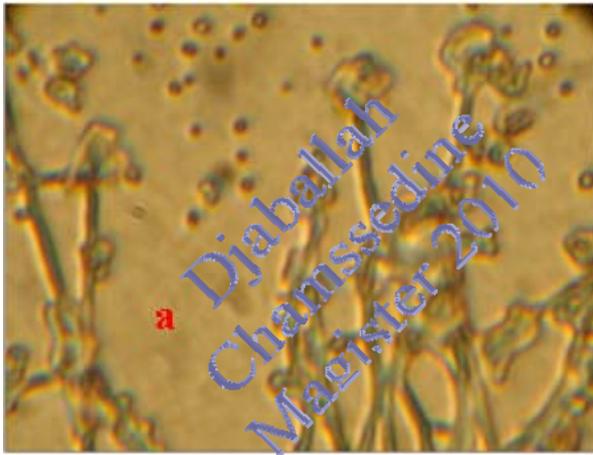


**Photographie n°21** de la souche SS23 au grossissement (G x 100). (a) mycélium aérien (b) mycélium de substrat.

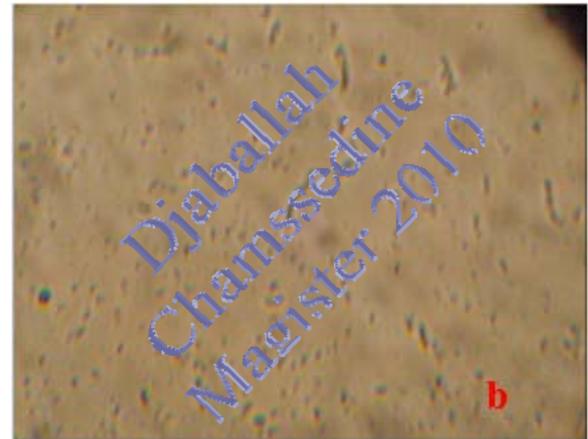
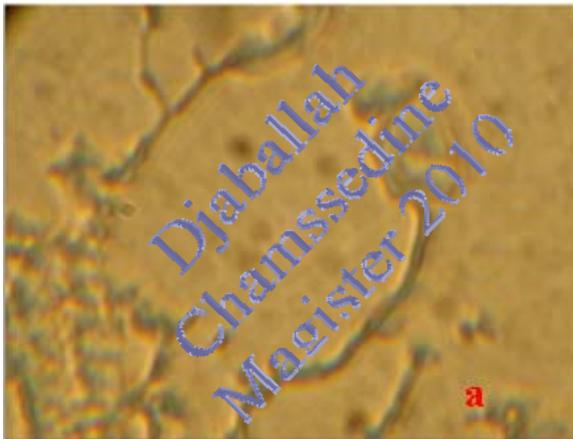


**Photographie n°22** de la souche SS25 : (a) mycélium aérien au grossissement (G x 100) et (b) mycélium de substrat au grossissement (G x 40).

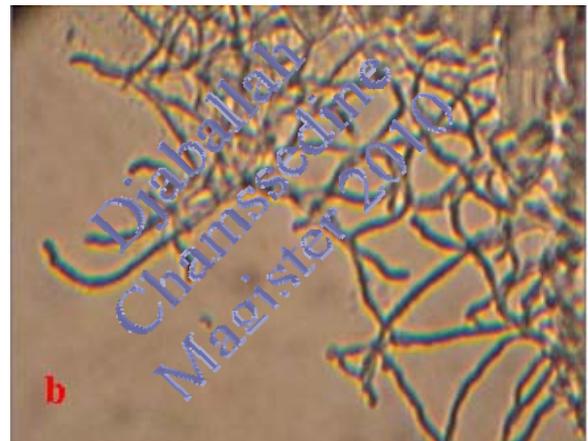
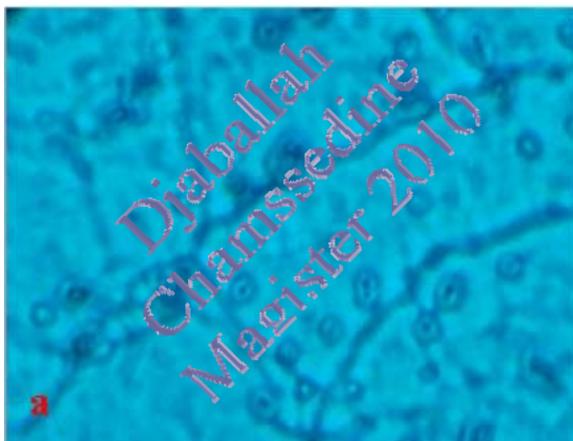
**Planche n°8** : Photographies des mycéliums des souches SS227. SS23. et SS25.



**Photographie n°23** de la souche SS28 au grossissement (G x100). (a) mycélium aérien (b) mycélium de substrat.

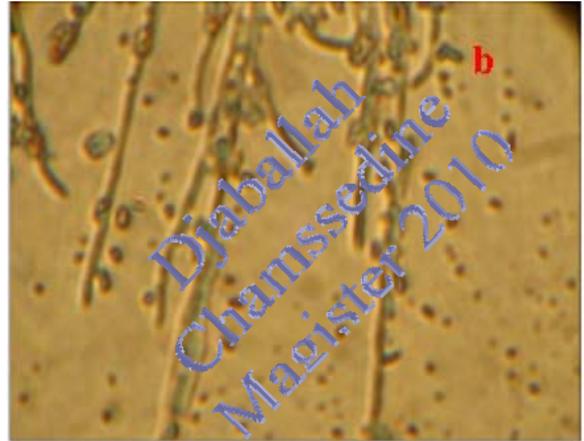
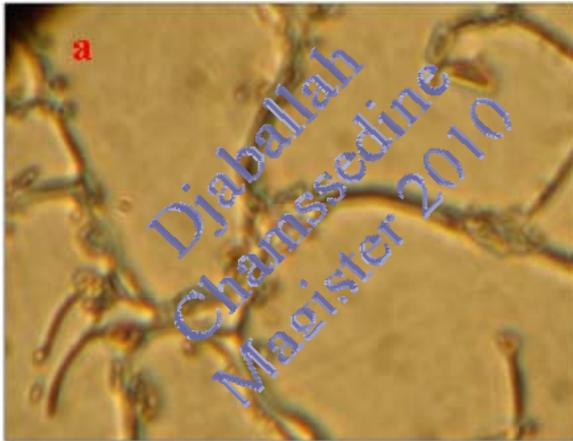


**Photographie n°24** de la souche SS220. (a) mycélium aérien au grossissement (Gx100) (b) mycélium de substrat au grossissement (G x40).

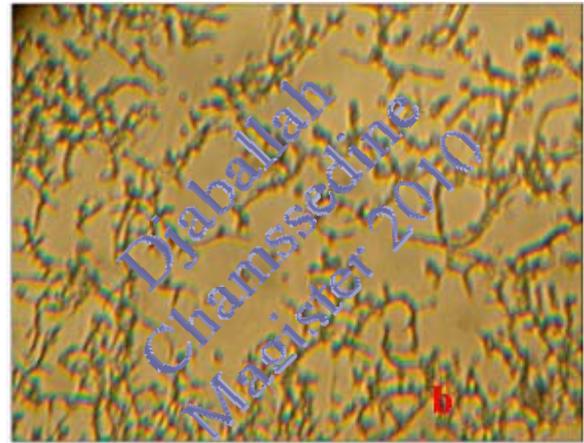
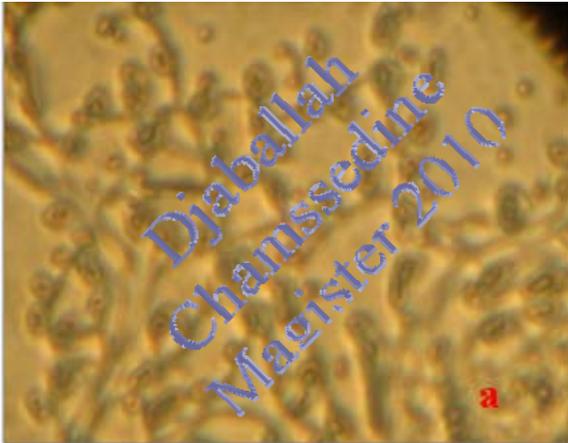


**Photographie n°25** de la souche SS21 au grossissement (G x40). (a) mycélium aérien (b) mycélium de substrat.

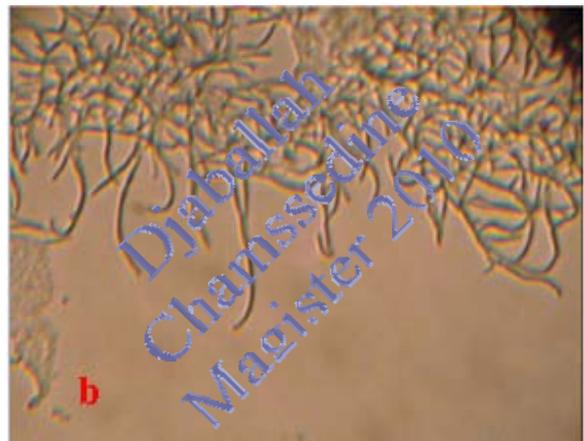
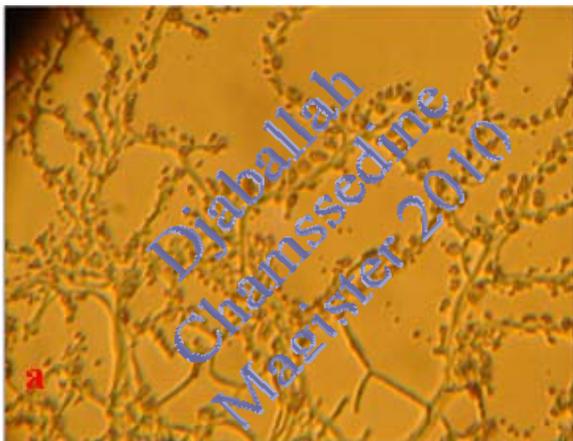
**Planche n°9** : Photographies des mycéliums des souches SS28, SS220, et SS21.



**Photographie n°26** de la souche SS211 au grossissement (G x40). (a) mycélium aérien (b) mycélium de substrat.

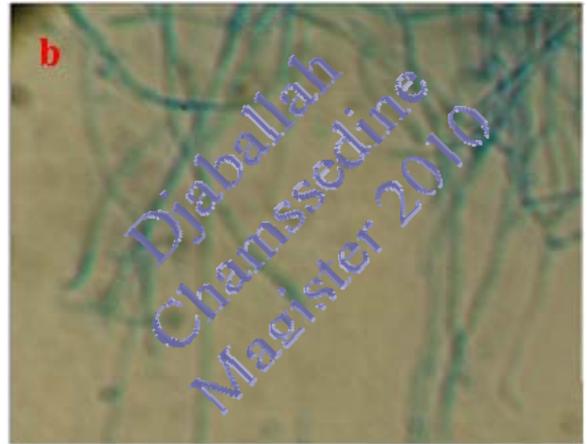
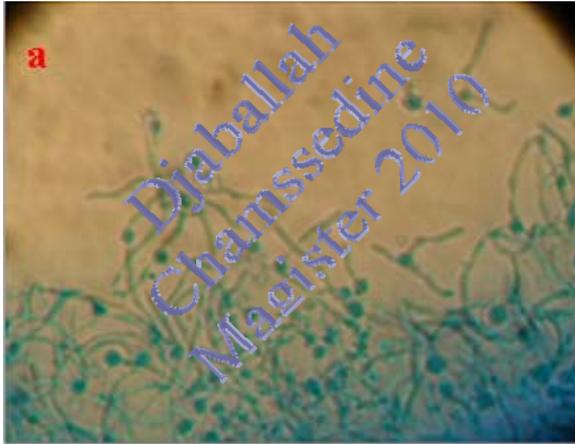


**Photographies n°27** de la souche SS212. (a) mycélium aérien au grossissement (G x100) (b) mycélium de substrat au grossissement (G x40).

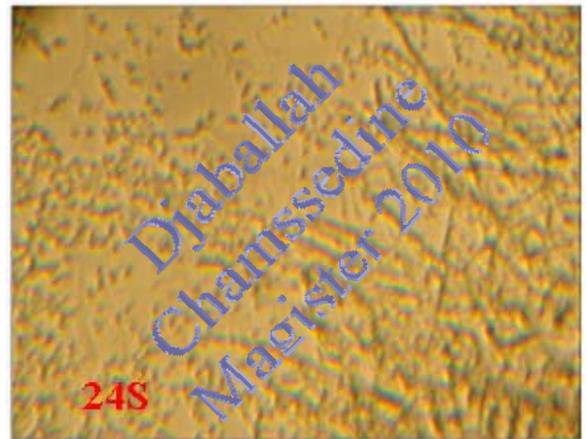
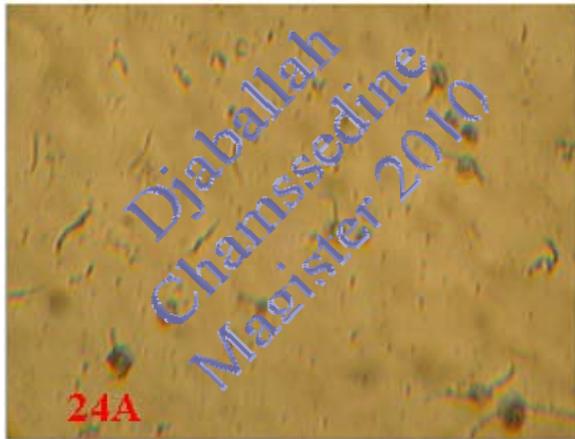


**Photographies n°28** de la souche SS213 au grossissement (G x40). (a) mycélium aérien (b) mycélium de substrat.

**Planche n°10** : Photographies des mycéliums des isolats SS211, SS12. et SS213.

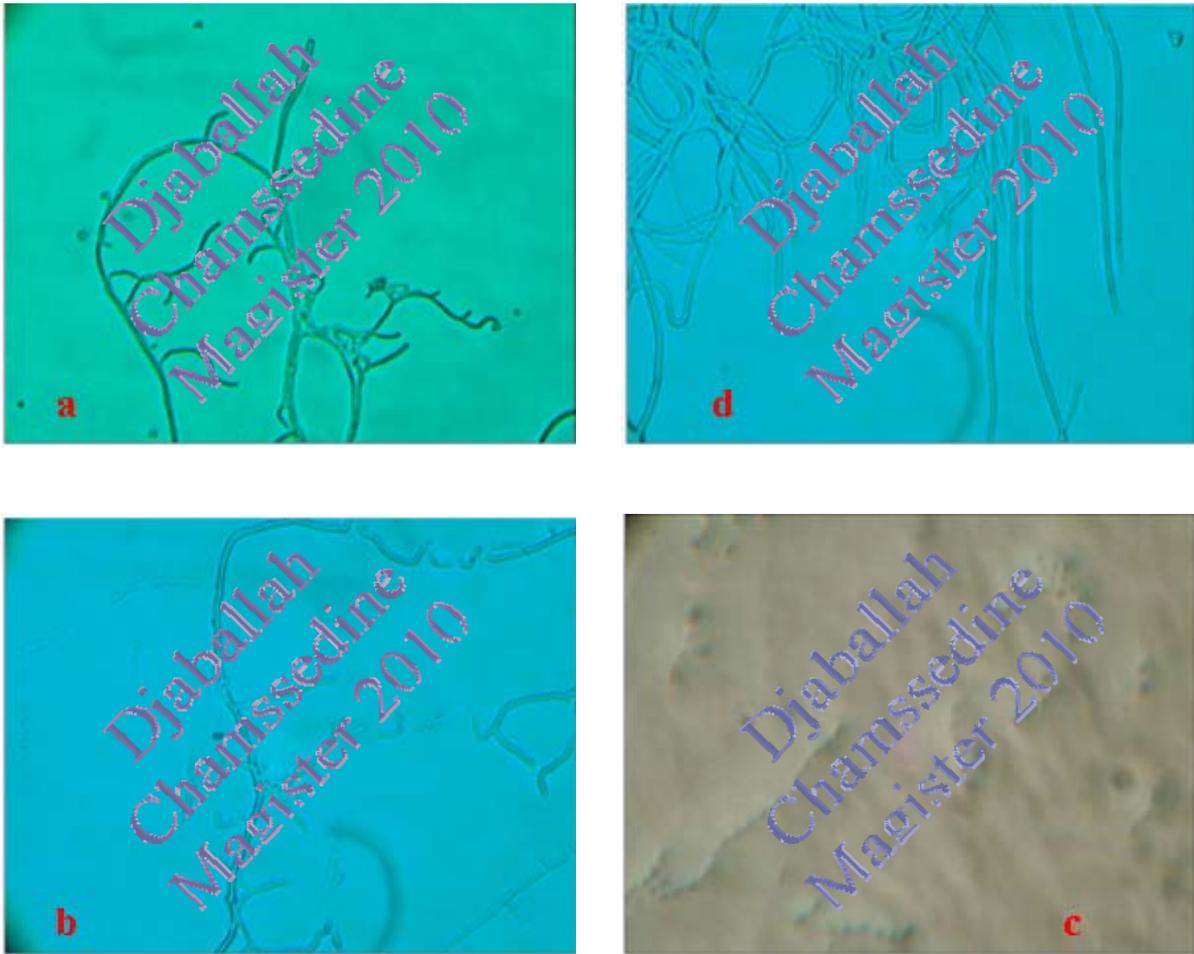


**Photographie n°29** de la souche SS228 au grossissement (G x100). (a) mycélium aérien (b) mycélium de substrat.



**Photographie n°30** de la souche SS219 au grossissement (G x40). (a) mycélium aérien (b) mycélium de substrat.

**Planche n°11** : Photographies des mycéliums des isolats SS228 et SS219.



**Photographie n°31** de la souche SS216 au grossissement (G x40) (a), (b) et (c) mycélium aérien, (d) mycélium de substrat.

**Planche n°12** : Photographies des mycéliums de l'isolat SS216.

Le tableau n°13 suivant récapitule les différents résultats de ce travail.

**Tableau n°13 : Genres probables des souches actinomycètes isolées de Sebka de Ain M'lila.**

Souches	Mycélium aérien		Mycélium de base		Structures particulières	Chaînes de spores	A.A.R	Genres probables
	Présence ou Absence	Fragmen-tation	Présence ou absence	Fragmen-tation				
SS24	+	-	N.D	N.D	-	23 à 38	Faible	<i>Streptomyces, Saccharopolyspora</i>
SS2HA	+	-	+	-	-	+	Faible	<i>Actinopolyspora, Kitasatospora</i>
SS2JIM	+	-	+	-	-	14 à 45	Faible	
SS210	+	-	+	+	Sporanges	-	Faible	<i>Nocardioopsis</i>
SS215	+	-	+	-	-	-	Faible	
SS222	+	-	+	+	-	-	Faible	
SS214	-	-	+	-	-	-	Faible	<i>Oerskovia, Jonesia</i>
SS2A	+	-	+	-	-	+	Faible	<i>Actinopolyspora</i>
SS223	+	-	+	-	-	-	Faible	
SS32	+	-	+	-	-	-	Faible	
SS4K	+	-	+	-	-	-	Faible	
SS2KHA	+	-	N.D	N.D	-	-	Faible	
SS22	+	-	+	+	Sporanges	-	Faible	<i>Actinoplanes, Ampullariella, Pimilia</i>
SS29	+	-	+	-	Sporanges	-	Faible	
SS217	+	-	+	-	Sporanges	-	Faible	
SS227	+	-	+	-	Sporanges	-	Faible	
SS23	+	-	+	+	Sporanges	-	Faible	<i>Streptosporangium, Spirillospora</i>
SS25	+	-	+	-	Sporanges	-	Faible	
SS28	+	-	+	-	Sporanges	-	Faible	
SS220	+	-	+	+	Sporanges	-	Faible	
SS21	+	-	+	-	Vésicules	-	Faible	<i>Dactylosporangium, Streptoaloteichus</i>
SS211	+	-	+	+	Vésicules	-	Faible	
SS212	+	-	+	+	Vésicules	-	Faible	
SS213	+	-	+	+	Vésicules	-	Faible	
SS228	+	+	+	-	Sporanges	-	Faible	
SS219	+	+	+	+	Sporanges	-	Faible	<i>Intrasporangium</i>
SS216	+	+	+	-	Corémies	4 à 6	Faible	<i>Actinosynnema, Streptomyces</i>

N.D : Non déterminé, A.A.R : Acidoalcoolorésistance.

## 5/- Biodiversité métabolique

Les résultats des différents tests réalisés sont présentés dans le tableau n°12

**Tableau n°14** : Biodiversité métabolique des souches actinomycètes du sol de Sebkh

Souches	Production de pigment mélanéoïde sur ISP7	Hydrolyse de l'amidon	Liquéfaction de la gélatine	Hydrolyse de la caséine	Action sur le lait écrémé
SS32	-	+	-	ND	Coagulation + peptonisation
SS4K	+	+	+	+	Coagulation + peptonisation
SS2A	+	+	+	+	Coagulation
SS2JIM [JIM]	+	+	+	-	Coagulation
SS2KHA	-	+	-	+	-
SS2HA	+	+	+	-	Peptonisation
SS21	-	+	+	ND	Coagulation
SS22	+	+	-	+	-
SS23	-	-	+	ND	-
SS24	-	-	+	+	Coagulation
SS25	+	+	+	ND	-
SS28	-	-	-	ND	Coagulation + peptonisation
SS29	-	+	-	+	Coagulation
SS210	-	+	+	-	Coagulation
SS211	-	+	+	+	Coagulation
SS212	-	-	+	-	Coagulation + peptonisation
SS213	-	-	+	-	Peptonisation
SS214	-	-	+	-	Coagulation
SS215	-	-	+	+	Coagulation
SS216	-	-	+	-	-
SS217	+	+	-	+	Coagulation + peptonisation
SS219	-	-	+	-	-
SS220	-	+	-	ND	Coagulation + peptonisation
SS222	-	-	+	ND	-
SS223	-	+	-	-	Coagulation
SS227	-	-	+	ND	-
SS228	+	+	+	+	-

(+) Hydrolyse, (-) Absence d'hydrolyse, **ND** : Non déterminé

D'après les résultats exprimés dans le tableau 12, il apparaît une biodiversité métabolique remarquable entre les actinomycètes isolés. 16 souches sont amylolytiques, dont 9 souches halophiles et 7 souches halotolérantes. Au moins 10 souches sont capables de dégrader la caséine, dont cinq sont halophiles et cinq sont halotolérantes. Dix-neuf (19) souches actinomycètes dégradent la gélatine, dont sept sont des halophiles et douze des halotolérants. Trois types d'actions peuvent être induites par les souches actinomycètes isolées :

1. Une coagulation du lait écrémé : il s'agit des souches halophiles SS2A, SS2JIM et SS223. et des souches halotolérantes SS21, SS24, SS29, SS210, SS211, SS214, et SS215.

2. Une peptonisation du lait écrémé : c'est le cas de souches halophiles SS2HA et SS213.

3. Une coagulation et une peptonisation du lait écrémé : c'est le cas de la souche halophile SS2JIM et des souches halotolérantes SS212 et SS215.

La production de pigment mélanoïde sur le milieu ISP7 n'a été observée que par 8 souches actinomycètes, dont 6 sont des halophiles et 2 seulement sont des halotolérantes.

# **Conclusion et Perspectives**

## **Conclusion générale et perspectives :**

Afin d'étudier la biodiversité des actinomycètes halophiles et halotolérants isolés de quatre échantillons de sol de Sebka, un protocole d'isolement et d'identification jusqu'au niveau genre à été adopté.

L'échantillon n°1 présente une conductivité très élevée qui le place parmi les sols très salés. Il est caractérisé par un taux d'humidité élevé, et de matière organique faible. Le pH du sol est neutre.

L'échantillon n°2 présente une conductivité extrêmement élevée qui le place parmi les sols extrêmement salés. Il est caractérisé par un taux d'humidité faible, et de matière organique très élevé. Le pH du sol est légèrement alcalin.

L'échantillon n°3 présente une conductivité extrêmement élevée qui le place parmi les sols extrêmement salés. Il est caractérisé par un taux d'humidité faible, et de matière organique faible. Le pH du sol est neutre.

L'échantillon n°4 présente une conductivité extrêmement élevée qui le place parmi les sols extrêmement salés. Il est caractérisé par un taux d'humidité modéré. La matière organique est sous forme de traces. Le pH du sol est légèrement alcalin.

Parmi les trois milieux de culture utilisés pour l'isolement des actinomycètes, seul le milieu ISP5 additionné de 15% de NaCl à donné de bon résultats.

Pour arriver à favoriser la croissance des actinomycètes, nous avons eu recours à deux types de prétraitement du sol, et il s'est avéré que le prétraitement au CaCO<sub>3</sub>, qui jouait le rôle d'un dessiccateur du sol, donne de meilleurs résultats comparés au prétraitement thermique. Nous avons également pu constater que le prétraitement au CaCO<sub>3</sub> réduit le nombre de bactéries et de champignons dans le sol, ce qui est en faveur des actinomycètes.

Grâce au protocole suivi pour l'isolement d'actinomycètes halophiles et halotolérantes, nous avons pu isoler 63 colonies actinomycètes à partir du sol des échantillons numéros 2, 3 et 4, ce qui correspond à  $6.95 \times 10^2$  UFC par gramme de sol. Toutes ces souches sont soit halophiles soit halotolérantes à 15% de NaCl dans leur milieu de culture. A partir de

ces souches, nous avons choisies et purifiés 27 souches qui ont fait l'objet de notre recherche.

L'échantillon 2 contient le plus grand nombre d'actinomycètes avec un pourcentage de 4.4% de la flore bactérienne totale de cet échantillon, et à moindre degré l'échantillon 3 avec un pourcentage de 1.5% de sa flore bactérienne totale. Les actinomycètes de l'échantillon 4 ne représentés que 0.13% de la flore totale.

11 souches isolées et purifiées sont des actinomycètes halophiles dont quatre souches sont aptes à croître à 55°C, le reste regroupe des souches actinomycètes halotolérants dont huit d'entre elles montrent une aptitude à croître à 55°C. 19 souches actinomycètes isolées sont capables à croître à 45°C. En ce qui concerne le pH, nous avons pus constaté l'aptitude de 12 souches actinomycètes à croître sur un intervalle de pH allant de 5 à 9. Quatre isolats ont manifestées une aptitude à croitre sur un intervalle de pH allant de 5 à 7.4. et deux souches dans un intervalle de pH allant de 7.4 à 9. Touts ces résultats montrent une biodiversité physiologique remarquable des souches actinomycètes isolées.

Les actinomycètes sont connus par leur aptitude à dégrader la matière organique complexe, 17 souches sont amylolytiques avec 9 souches halophiles et 8 souches halotolérantes. Au moins 10 souches sont aptes a dégradés la caséine, dont cinq sont halophiles et cinq sont halotolérantes.

Toutes les souches ont montré une acido-alcool-résistance faible. La technique des lamelles, nous a permis de mettre en évidence une biodiversité morphologique des actinomycètes isolés. Alors que pour certaines souches, le mycélium de substrat se fragmente au bout de deux à trois semaines, pour d'autres souches il persiste et reste stable. Pour certaines le mycélium aérien porte des sporanges, et pour d'autres il y a formation de chaînes de spores plus moins courtes.

Grâce à cette biodiversité morphologique, nous avons arrivés à suspecter les genres suivants : *Actinopolyspora* avec un pourcentage de 22.2%, suivit des genres *Dactylosporangium* et *Streptoalloteichus* avec le pourcentage de 18.5%. Les genres *Streptosporangium*, *Spirillospora*, *Actinoplanes*, *Ampullariella*, et *Pilimelia* prennent la troisième position avec un pourcentage de 14.8%, suivies de *Nocardiosis* (11.1%) et de *Streptomyces* (7.4%). En dernière position viennent les genres *Oerskovia*, *Jonevia*, *Intrasporangium*, *Actinosynnema*, *Kitasatosporia*, et *Saccharopolyspora* avec un

pourcentage de 3.7%.

### **Perspectives :**

- ✓ Confirmer l'identification des genres par des techniques plus précises notamment la chimiotaxonomie ... et pousser l'identification des souches étudiées jusqu'au niveau espèce.
- ✓ Tester l'aptitude de ces souches à synthétiser des enzymes dégradants la cellulose, la pectine, la lignine, la chitine, les hydrocarbures, et les pesticides.
- ✓ Tester leur aptitude à produire des composés antibactériens et antifongiques, tout en étudiant leur structure chimique ainsi que leurs cibles, et la possibilité de leur usage dans le domaine pharmaceutique.
- ✓ Réétudier cet écosystème en utilisant pour l'isolement d'autres milieux de culture et différentes concentration de NaCl, afin d'isoler le maximum d'actinomycètes de cet écosystème.

# **Références Bibliographiques**

- **Al-Zarban S.S., Al-Musallam A.A., Abbas I., Stackebrandt E. and Kroppenstedt R.M.** (2002). *Saccharomonospora halophila* sp. nov., a novel halophilic actinomycete isolated from marsh soil in Kuwait. *Int. J. Sys. Ev. Microbiol.*, 52. 555-558.
- **Angehrn P., Buchmann S., Funk C., Goetschi E., Gmuender H., Hebeisen P., Kostrewa D., Link H., Luebbers T., Masciadri R., Nielsen J., Reindl P., Ricklin F., Schmitt-Hoffmann A. and Theil F.P.** (2004). New antibacterial agents derived from the dna gyrase inhibitor cyclothialidine. *J. Med. Chem.* 47. 1487-1513.
- **Basilio A., Gonza'lez I., Vicente M. F., Gorrochategui J., Cabello A., Gonza'lez A. and O. Genilloud O.** (2003). Patterns of antimicrobial activities from soil actinomycetes isolated under different conditions of pH and salinity. *J. Appl Microbiol.*, 95. 814-823.
- **Benimeli C.S., Amoroso M.J., Chaile A.P., Castro G.R.** (2003). Isolation of four aquatic streptomycetes strains capable of growth on organochlorine pesticides. *Bioresource Technology*, 89. 133-138.
- **Bernstein L.**, (1960). Les sols halomorphes et leurs végétations. *Unesco/NS/AZ/515*.
- **Boughachiche F., Reghioua S., Oulmi L., Zerizer H., Kitouni M., Boudemagh A. and Boulahrouf A.** (2005). Isolement d'actinomycetales productrices de substances antimicrobiennes à partir de la sebkha de Ain M'Lila. *Sciences & Technologie C-n°23*. pp. 5-10.
- **Chater U.F. and Merrick M.J.** (1979). Streptomycètes in *Developmental Biology of Procyotes*. Ed. J.H. PARISH. University of California Press, Berkeley and Los Angeles. 93-114.
- **Chun J., Bae K.S., Moon E.Y., Jung S.O., Lee H.K. and Kim S.J.** (2000). *Nocardiopsis kunsanensis* sp. nov., a moderately halophilic actinomycete isolated from a saltern. *Int. J. Sys. Ev. Microbiol.*, 50. 1909-1913.
- **Cook A. E. and Paul R. Meyers P.R.** (2003). Rapid identification of filamentous actinomycetes to the genus level using genus-specific 16S rRNA gene restriction fragment patterns. *Int. J. Sys. Ev. Microbiol.*, 53. 1907-1915.
- **De Boer W., Gunnewiek P.J.A.K., Lafeber P., Janse J.D., Spit B.E. and Woldendorp J.W.** (1998). Anti-fungal properties of chitinolytic dune soil bacteria. *Soil Biol. Biochem.* Vol. 30. No. 2. pp. 193 - 203.
- **El-Nakeeb M.A. and Lechvalier H.A.**, (1963). Selective isolation of aerobic

- actinomycetes. *Appl. Microbiol.* 11. 75-77.
- **Ghanem N.B., Sabry S.A, El-Sherif Z.M. and Abu El-Ela1 G.A.** (2000). Isolation and enumeration of marine actinomycetes from seawater and sediments in Alexandria. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 46. 105-111.
  - **Goodfellow and Cross** (1984). In **Embley T.G., O'Donnell M.A., Rostron J. and Goodfellow M.** (1987). Chemotaxonomy of wall type IV actinomycetes which lack mycolic acids. *J. Gen.l Microbiol.*, 134. 953-960.
  - **Gordon R.E. and Smith M.M.** (1953). Rapidly growing, acid fast bacteria I. Species descriptions of *Mycobacterium phlei*. *J. Bact.*, 66. 41-48.
  - **Gottlieb D.**, (1973). General consideration and implication of the *Actinomycetales*. In *Actinomycetales characteristics and practical importance. Edited by G. Sykes and F. A. Skinner. Academic Press, London, New York.*
  - **Holt J.G., Krieg N.R., Sneath P.H.A., Staley J.T. and Williams S.T.** (1994). Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. *Williams and Wikins.*
  - **Huang Y., Cui Q., Wang L., Rodriguez C., Quintana E., Goodfellow M. and Liu Z.** (2004). *Streptacidiphilus jiangxiensis* sp. nov., a novel actinomycete isolated from acidic rhizosphere soil in China. *Antonie van Leeuwenhoek* , 86. 159-165.
  - **Imada C.**, (2005). Enzyme inhibitors and other bioactive compounds from marine actinomycetes. *Antonie van Leeuwenhoek.* 87. 59-63.
  - **Jensen P.R., Dwight R. and Fenical W.** (1991). Distribution of actinomycetes in near-shore tropical marine sediments. *Appl. Enviro. Microbiol.*, p. 1102-1108.
  - **Keast D., Rowe P., Sanfelieu L., Shannahan J., Bowra B., Skates S., Stapley E.O. and Woodruff H.B.** (1984). Use of a computer to group actinomycetes for studies on the ecology of soil microorganisms. *Appl. Enviro. Microbiol.*, p. 791-796.
  - **Kim B., Al-Tai A.M., Kim S.B., Somasundaram P. and Michael Goodfellow M.** (2000). *Streptomyces thermocoprophilus* sp. nov., a cellulase-free endo-xylanase-producing streptomycete. *Int. J. Sys. Ev. Microbiol.*, 50. 505-509.
  - **Kitouni M., Boudemagh A., Oulmi L., Reghioua S., Boughachiche F., Zerizer H., Hamdiken H., Couble A., Mouniee D., Boulahrouf A., Boiron P.**, (2005). Isolation of actinomycetes producing bioactive substances from water, soil and tree bark samples of the north-east of Algeria. *Journal de Mycologie Médicale*, **15**, 45-51.
  - **Kuo M.J. and Hartman P.A.** (1966). Isolation of amylolytic strains of *Thermo-*

- actinomyces vulgaris* and production of thermophilic actinomycete amylases, *J. Bacteriol.* Vol. 92. No. 3.
- **Larpent J.P. et Larpent-Gourgaud M.** (1985). Manuel pratique de microbiologie. *Herman. Paris.*
  - **Lee, S. D.** (2006). *Amycolatopsis jejuensis* sp. nov. and *Amycolatopsis halotolerans* sp. nov., novel actinomycetes isolated from a natural cave. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **56**, 549-553.
  - **Lee J.Y. and Hwang B.K.**, (2002). Diversity of antifungal actinomycetes in various vegetative soils of Korea. *Can. J. Microbiol.* 48. 407-417.
  - **Li W.J., Kroppenstedt R.M., Wang D., Tang S.K., Lee J.C., Park D.J., Kim C.J., Xu L.H. and Jiang C.L.** (2006). Five novel species of the genus *Nocardiopsis* isolated from hypersaline soils and emended description of *Nocardiopsis salina* Li et al. 2004. *Int. J. Sys. Ev. Microbiol.*, 56. 1089-1096.
  - **Li X.** (1997). *Streptomyces cellulolyticus* sp. nov., a new cellulolytic member of the genus *Streptomyces*. *Int. J. Sys. Bact.*, p. 443-445.
  - **Locci R.** (1976). “Developmental micromorphology of actinomycetes”. In: *Actinomycetes, the boundary microorganisms. Arai T. Ed., Tokyo.* 170-180.
  - **McNeil M.M. and Brown J.M.** (1994). The medically important aerobic actinomycetes: Epidemiology and Microbiology. *Clin. Microbiol. Rev.* **7**, 357-417.
  - **Oren A.** (2002). Diversity of halophilic microorganisms: Environments, phylogeny, physiology, and applications. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 28. 56-63. *Can. J. Microbiol.* 48. 407-417.
  - **Oskay M., Tamer A.U. and Azeri C.** (2004). Antibacterial activity of some actinomycetes isolated from farming soils of Turkey. *African Journal of Biotechnology*. Vol. 3 (9), pp. 441-446.
  - **Perry J.J., Staley J.T., Lory S.** (2004). *Microbiologie. Edition Dunod.*
  - **Petrosyan P., Garcí'a-Varela M., Luz-Madriral A., Huitro'n C. and Flores M. E.** (2003). *Streptomyces mexicanus* sp. nov., a xylanolytic micro-organism isolated from soil. *Int. J. Sys. Ev. Microbiol.*, 53. 269-273.
  - **Pochon J. et Tardieux P.**, (1962). Techniques d'analyse en microbiologie du sol. *Edition de la tourelle, St. Mandé.* pp. 110-111.
  - **Prescott L.M., Harley J.P., and Klein D.A.** (2007). *Microbiologie. Edition De Boeck*

*et Larcier.*

- **Pridhan T.G. and Gottlieb D.** (1948). The utilization of carbon compounds by some Actinimycetales as an aid for species determination. *J. Bacteriol.*, 56. 107-114.
- **Richards L.A.** (1969). Diagnostic and improvement of saline and alkaline soils. *Agricultural Handbook*. No. 60.
- **Scriban R.** (1993). Biotechnologie. 4<sup>ème</sup> édition. *Technique et documentation-Lavoisier*. Paris
- **Shirling E.B. and Gottlieb D.** (1966). Methods for characterization of *Streptomyces* species. *Int. J. Syst. Bact.*, 16. 313-340.
- **Silvey J.K.G. & Roach A.N.** (1975). The taste and odour producing aquatic actinomycetes. *Crit. Rev. Environ. Control*. 5. 233-273.
- **Stackebrandt E., Rainey F.A. and Ward-Rainey N.L.** (1997). Proposal for new hierarchic classification system, *Actinobacteria* classic nov. *Int. J. Syst. Bact.* 47; 2. 479-491.
- **Sukumaram C.P., Singh D.V., Khedkar P.D. and Mahadevan P.R.** (1979). An actinomycete producing L-3,4-dihydroxyphenylalanine from L-tyrosine. *J. Biosci.*, Vol. 1. Number 2. pp. 236-239.
- **Sykes G. and Skinner F.A.** (1973). Actinomycetales: Characteristics and practical importance. *Academic press. London. New York*.
- **Takizawa M., Colwell R.R. and Hill R.T.** (1993). Isolation and Diversity of Actinomycetes in the Chesapeake Bay. *Appl. Enviro. Microbiol.*, 997-1002.
- **Theilleux J. In Levreau J.Y. and Bouix M.** (1993) Microbiologie industrielle. Les micro-organismes d'intérêt industriel. Lavoisier, Paris. Ch : 6 425-481. *Technique et documentation. Lavoisier. Paris*.
- **Tiquia S.M., Davis D., Hadid H., Kasparian S., Ismail M., Sahly R., Shim J., Singh S. and Murray K.S.** (2006). Halophilic and halotolerant bacteria from river waters and shallow groundwater along the rouge river of southeastern Michigan. *Environmental Technology*, Vol. 28. pp 297-307.
- **Tresner H.D., Hayes J.S. and Backus E.J.** (1968). Differential tolerance of Streptomycetes to sodium chloride as a taxonomic tool. *Appl. Microbiol.* 16: 1134-1136.

- **Wang L., Huang Y., Liu Z., Goodfellow M. and Rodríguez C.**, (2006). *Streptacidiphilus oryzae* sp. nov., an actinomycete isolated from rice-field soil in Thailand. *Int. J. Sys. Ev. Microbiol.*, 56. 1257-1261.
- **Williams S.T. and Cross T.** (1971). "Actinomycetes." *In* Methods in microbiology. *Booth C. Ed., Academic Press, London.* 4. 295-334.
  
- **Williams S.T., Goodfellow M., Wellington E.M.H., Vickers J.C., Alderson G., Sneath P.H.A., Sackin M.J. and Mortimer A.M.** (1983). A probability matrix for identification of some streptomycetes. *J. Gen. Microbiol.* 129: 1815-1830.
- **Yoshida M., Matsubara K., Kudo T. and Horikoshi K.** (1991). *Actinopolyspora mortivallis* sp. nov., a moderately halophilic actinomycete. *Int. J. Syst. Bact.* P. 15-20.
- **Zaitlin B. and Watson S.B.** (2006). Actinomycetes in relation to taste and odour in drinking water: Myths, tenets and truths. *Water Research*, 40. 1741 - 1753.

# **Annexe**

## Milieux de cultures

### Milieu de Bennett :

D-Glucose anhydre	10 g
Casaminoacides	2 g
Extrait de Levure	1 g
Extrait de Viande	1 g
Agar	15 g
Eau distillée qsp	1 000 ml

PH = 7,3

### Milieu Olson :

Sodium Caseinate	2 g
L-Asparagine	0,1 g
Sodium Propionate	4 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,5 g
FeSO <sub>4</sub>	0,01 g
Agar	15 g
Eau distillée qsp	1 000 ml

PH = 7,2

### Milieu ISP5 :

Glycérol	10 g
L-Asparagine	1 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1 g
Solution saline <sup>1</sup>	1 ml
Agar	20 g
Eau distillée qsp	1 000 ml

PH = 7 – 7,4

### Milieu ISP7 :

Glycérol	15 g
L-Asparagine	1 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,5 g
NaCl	0,5 g
FeSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	0,01 g
Agar	20 g
Eau distillée qsp	1 000 ml

PH = 7,2-7,4

**Milieu GELM :**

Extrait de Malt	10 g
Extrait de Levure	4 g
Glucose	4 g
Agar	20 g
Eau distillée qsp	1 000 ml

PH = 7.2

**Milieu GLM : Gélose à l'extrait de levure - extrait de malte**

Extrait de Levure	3 g
Extrait de Malte	3 g
Peptone	5 g
Glucose	10 g
Agar	20 g
Eau distillée qsp	1 000 ml

PH = 7.2

**Solution saline<sup>1</sup> :**

FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,1 g
MnCl <sub>2</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,1 g
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,1 g
Eau distillée qsp	100 ml

**N.B :** L'ajustement du pH des milieux de cultures s'effectue à l'aide d'une solution de NaOH 1N ou solution d'HCl 1N selon le cas.

## ملخص

63 سلالة actinomycétales تم عزلها من خلال أربع عينات من تربة السبخة والتي تقع في ضواحي مدينة عين مليلة. بعد عدة تحاليل أجريت على هذه العينات اتضح بأنها تربة مالحة جدا، مما يجعل منها أوساط غير مواتية للحياة. عزل هذه السلالات تم بواسطة الوسط ISP5 والذي أضيف إليه 15% من كلوريد الصوديوم وقد تبين من خلال هذا البحث أن معالجة التربة قبل مرحلة العزل بكاربونات الكالسيوم أنت بنتائج إيجابية لصالح عزل الأكتينومييسات وذلك بخفض نسبة الفطريات في التربة.

جميع هذه السلالات كانت إما محبة للملوحة أو مطيقة للملوحة، اخترنا من بينها 27 سلالة نقية وقد تبين أن 40,7% منها محبة للملوحة، بينما النسبة الباقية 59,3% مطيقة للملوحة. وقد لوحظ أن 33,3% من هذه الأكتينومييسات تنمو في وسط مشبع بكلوريد الصوديوم، وأن 44,4% منها تنمو في درجة حرارة 55 درجة مئوية.

بعد إجراء عدة تجارب تبين لنا أن هذه السلالات المعزولة تتمتع في مجملها بتنوع فيزيولوجي، مورفولوجي وأيضي لافت للانتباه.

## كلمات مفتاحية

أكتينومييسات، محبة للملوحة، مطيقة للملوحة، أوساط غير مواتية للحياة، تنوع حيوي

## **Résumé**

63 souches actinomycétales ont été isolées de quatre échantillons de sol de la sebkha de Ain M'lila. Les échantillons en question sont considérés, après mesure de la conductivité de chacun d'eux, comme étant des sols extrêmement salins, ce qui rend ces échantillons comme écosystèmes extrêmes. L'isolement a été réalisé sur le milieu ISP5 additionné de 15% de NaCl. Le prétraitement du sol au CaCO<sub>3</sub> s'est montré en faveur de l'isolement des actinomycètes. Toutes les souches isolées sont soit des halophiles, soit des halotolérantes. Nous avons sélectionné et purifié 27 souches de l'ensemble des souches isolées. Il s'est avéré que 40,7% de l'ensemble des isolats sont des halophiles et 50,9% sont des halotolérants. Il est important de noter que 33,3% des actinomycètes isolés poussent en saturation de NaCl, et que 44,4% des isolats sont aptes à croître à 55°C. Après différents tests réalisés, nous avons pu distinguer une biodiversité physiologique, métabolique et morphologique remarquable.

**Mots clés :** Actinomycètes, halophilie, halotolérance, écosystème extrême, biodiversité.

## **Abstract**

63 Actinomycetales strains were isolated from four soil samples of the sebkha of Ain M'lila. The samples in question are considered, after measuring of their conductivity, as being highly saline soil, which makes of these samples as extreme ecosystems. The isolation was achieved on the ISP5 medium supplemented with 15% NaCl. Pretreatment of soil with CaCO<sub>3</sub> was in favor of the isolation of actinomycetes. All strains isolated were either halotolerant or halophilic. We selected 27 strains and purified all strains isolated. It was found that 40,7% are halophilic and 59,3% are halotolerant. It is important to note that 33,3% of isolated actinomycetes grow in saturated NaCl, and 44,4% are able to grow at 55°C. After various tests performed, we are able to distinguish a remarkable physiologic, morphologic, and metabolic biodiversity.

**Keywords :** Actinomycete, halophilic, halotolerance, extreme ecosystem and biodiversity

Nom : **DJABALLAH**  
Prénom : **Chamsseddine**

Date de soutenance : 04/07/2010

**Diplôme : Magister**

**Thème : Biodiversité des Actinomycètes Halophiles et Halotolérants  
Isolés de la sebkha de Ain M'lila**

### **Résumé**

63 souches actinomycétales ont été isolées de quatre échantillons de sol de la sebkha de Ain M'lila. Les échantillons en question sont considérés, après mesure de la conductivité de chacun d'eux, comme étant des sols extrêmement salins, ce qui rend ces échantillons comme écosystèmes extrêmes. L'isolement a été réalisé sur le milieu ISP5 additionné de 15% de NaCl. Le prétraitement du sol au CaCO<sub>3</sub> s'est montré en faveur de l'isolement des actinomycètes. Toutes les souches isolées sont soit des halophiles, soit des halotolérantes. Nous avons sélectionné et purifié 27 souches de l'ensemble des souches isolées. Il s'est avéré que 40,7% de l'ensemble des isolats sont des halophiles et 50,9% sont des halotolérants. Il est important de noter que 33,3% des actinomycètes isolés poussent en saturation de NaCl, et que 44,4% des isolats sont aptes à croître à 55°C. Après différents tests réalisés, nous avons pu distinguer une biodiversité physiologique, métabolique et morphologique remarquable.

### **Mots clés**

Actinomycètes, halophilie, halotolérance, écosystème extrême, biodiversité.

Laboratoire de recherche : Génie Microbiologique et Applications

Directeur de recherche : **M. KITOUNI M**

Devant le jury :

**Président : M. BENGUEDOUAR A.** Professeur UMC

**Rapporteur : M. KITOUNI M.** Maître de conférences UMC

**Examineur :**

**M. BENHIZIA Y.** Maître de conférences UMC

**M. BOUDEMAGH A.** Maître de conférences UMC

**M. HADDI M.L.** Maître de conférences UMC