

République Algérienne Démocratique et populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Mentouri Constantine
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biochimie et de Microbiologie

Mémoire

Présenté pour l'obtention du diplôme de

Magistère en Microbiologie Appliquée

Option : Biotechnologies microbiennes

Par

Zermane Férial

Thème

***Etude des caractéristiques culturelles des actinomycètes impliquées
dans la biodégradation de la cellulose, des substances pectiques
et des composés organiques de synthèse***

Devant le jury :

Président :	<i>Mr. Bousseboua H.</i>	<i>Prof. Université Mentouri Cne</i>
Rapporteur :	<i>Mr. Boulahrouf A.</i>	<i>Prof. Université Mentouri Cne</i>
Examineurs :	<i>Mme. Mechakra A.</i>	<i>M.C. Université Mentouri Cne</i>
	<i>Mr. Kitouni.M.</i>	<i>M.C. Université Mentouri Cne</i>

Année universitaire : 2007-2008

Dédicaces

Je dédie ce travail :

*À mes très chers parents que j'aime plus que tous au monde et à
lesquelles je dois toute ma vie et toutes mes réussites.*

*À mon très cher fiancé Issam pour son aide et ses
encouragement et à toute sa famille.*

À mes sœurs, leurs époux et leurs enfants

À mes deux frères Ali et Naji

À toute ma famille et toutes mes amies

En témoignage de ma profonde affection

Férial

Remerciements

Ce travail a été effectué au sein du laboratoire de génie microbiologique et applications, faculté de sciences de la nature et de la vie, département de Biochimie et de Microbiologie, université Mentouri Constantine.

Je tiens à remercier, en tout premier lieu, Monsieur le Professeur A. Boulahrouf qui a bien voulu diriger ce travail, pour ses conseils, sa compétence et sa gentillesse qui m'ont permis de bien mener ce travail.

Je remercie également monsieur le Professeur H. Bousseboua qui n'a pas hésité à tout moment d'offrir son aide scientifique et m'a fait l'honneur d'être le président de ce jury.

Mes plus vifs remerciements s'adressent aux Maîtres de Conférences Madame A. Mechakra et Monsieur M. Kitouni pour avoir accepté d'être membres de ce jury.

Je remercie, particulièrement, Mademoiselle Habiba Zerizer pour ses encouragements et ses conseils qui m'ont beaucoup aidé pour réaliser ce travail.

J'associe à mes remerciements toute l'équipe du laboratoire de génie microbiologique et applications ainsi que tous mes collègues pour leur solidarité.

Liste des abréviations

CTAB: bromure d'héxadécyl tri-méthyl ammonium.

CYD: casamino acids yeast extracts D-glucose.

DAP : l'acide 2,6-diaminopimélique

DAB : acide 2,4 diaminobutyrique.

GSEA : glycérol-extrait de sol.

ISP : International *Streptomyces* Project.

ONPG: ortho-nitrophényl-Béta-Galactoside.

PCB : chlorobiphényles.

PAH_s: polycyclic aromatic hydrocarbons.

SCE : source de carbone et d'énergie.

SEM: scanning electron microscopy.

Liste des figures

- Figure N°1 :** Structure moléculaire de la cellulose, d'après Odier (1985).
- Figure N°2 :** Structure moléculaire de la pectine (Perez *et al.*, 2000).
- Figure N°3 :** Structure moléculaire du 2,5-xylénol.
- Figure N°4 :** Structure moléculaire du 2,6-xylénol.
- Figure N°5 :** Exemples de genres actinomycétales photographiés en microscope électronique. Photos dans l'Atlas des actinomycètes 1997 (Joachin, 2002).
- Figure N°6 :** Croissance d'une colonie d'actinomycètes sur milieu solide.
- Figure N°7 :** Cycle de vie des *Streptomyces*.
- Figure N°8 :** Exemples de formes de chaînes de spores des actinomycètes ; Photos dans l'Atlas des actinomycètes 1997 (Joachin, 2002).
- Figure N°9 :** La classification hiérarchique de la classe *Actinobacteria* basée sur l'analyse phylogénétique de l'ADNr / l'ARNr 16S (Garrity *et al.*, 2004).
- Figure N°10:** SEM micrographe de la croissance de *R. opacus* sur milieu minéral contenant le toluène comme seule source de carbone et d'énergie (Tsitko, 2007).
- Figure N°11 :** Biodégradation du papier filtre Whatman N°1 par la souche S2.
- Figure N°12 :** Diamètres des zones claires résultant de l'activité pectinolytique.
- Figure N°13 :** Zones claires résultant de l'activité pectinolytique de la souche K25.
- Figure N°14 :** Tolérance de la souche K25 au 2,5-xylénol et au 2,6-xylénol jusqu'à une concentration de 3000 mg/l (technique des disques).
- Figure N°15 :** Aspect macroscopique de la souche C1 sur milieu ISP2.
- Figure N°16 :** Production de pigments mélanoides par la souche K20.
- Figure N°17:** Aspect microscopique de la souche C1.
- Figure N°18 :** Sensibilité de la souche S6 au lysosyme.
- Figure N°19 :** Pourcentage des différents genres des souches actinomycétales actives.

Liste des tableaux

Tableau N°1 : Propriétés physico-chimiques des xylénols.

Tableau N°2 : Fréquence des divers genres d'actinomycètes dans le sol d'après l'étude de 5000 échantillons issus de 16 sols différents (**Lechevalier et Lechevalier, 1967**).

Tableau N°3 : Exemples d'actinomycètes impliquées dans le processus de compostage.

Tableau N°4 : Caractères d'identification présomptive des *Nocardia* et des autres genres d'actinomycètes apparentés au genre *Nocardia* (**Carlotti et al., 1994, Boiron et al., 1993**).

Tableau N°5 : Types pariétaux en fonction des constituants distinctifs majeurs des parois cellulaires (**Lechevalier et Lechevalier, 1980**).

Tableau N°6 : Types pariétaux et types glucidiques cellulaires des actinomycètes aérobies à méso-DAP (**Lechevalier et Lechevalier, 1980**).

Tableau N°7 : Exemples d'enzymes employées dans différents secteurs industriels (**Kirk et al., 2005**).

Tableau N°8 : Exemples de composés organiques synthétiques métabolisés par les actinomycètes.

Tableau N°9 : Description des échantillons

Tableau N°10 : Nombre de colonies d'actinomycètes prélevées.

Tableau N°11 : Croissance des souches actinomycétales sur le milieu de base ISP9 contenant la cellulose cristalline (Sigmacell type 101) comme unique source de carbone et d'énergie.

Tableau N°12 : Dégradation du papier filtre Whatman N°1 par les souches actinomycétales.

Tableau N°13 : Croissance des souches actinomycétales sur le milieu de base ISP9 contenant la pectine comme unique source de carbone et d'énergie.

Tableau N°14 : Diamètres de zones claires résultant de la dégradation de la pectine par les souches actinomycétales.

Tableau N°15 : Croissance des souches d'actinomycètes sur milieu minéral contenant le 2,5-xylénol et le 2,6-xylénol comme seule source de carbone et d'énergie.

Tableau N°16 : Tolérance des souches actives aux 2,5-xylénol et 2,6-xylénol.

Tableau N°17 : Aspect macroscopique des souches actinomycétales actives.

Tableau N°18 : Détermination des pigments mélanoides et diffusibles produit par les souches actinomycétales actives.

Tableau N°19 : Aspect microscopique des souches actinomycétales actives.

Tableau N°20 : Colorations et caractéristiques biochimiques des souches actinomycétales actives.

Tableau N°21 : Caractères physiologiques des souches actinomycétales actives.

Tableau N°22 : Récapitulatif des souches actives sur les composés organiques étudiés.

Sommaire

Introduction.....	1
--------------------------	----------

Etude bibliographique

1-Biodégradation (biodégradabilité) de la matière organique.....	4
---	----------

1-1-Définition.....	4
---------------------	---

1-2-Biodégradation des composés organiques complexes naturels.....	5
--	---

1-2-1-Généralités.....	5
------------------------	---

1-2-2-La cellulose.....	7
-------------------------	---

1-2-3-Les hémicelluloses.....	8
-------------------------------	---

1-2-4-La lignine.....	8
-----------------------	---

1-2-5-La pectine.....	10
-----------------------	----

1-3-Biodégradation des composés organiques de synthèse (xénobiotiques).....	10
---	----

1-3-1-Généralités.....	10
------------------------	----

1-3-2- Les pesticides (les xylénols).....	12
--	----

1-4-Techniques d'évaluation de la biodégradabilité des substances organiques.....	15
---	----

2- Les actinomycètes : agents de biodégradation dans la nature.....	18
--	-----------

2-1-Définition, caractéristiques principales et écologie.....	18
---	----

2-2-Biologie du développement.....	25
------------------------------------	----

2-2-1-Mycélium du substrat et Mycélium aérien.....	25
--	----

2-2-2-Formation des spores.....	26
---------------------------------	----

2-2-3-La germination des spores.....	27
--------------------------------------	----

2-2-4-Structures particulières.....	28
-------------------------------------	----

2-3-Détermination des genres.....	28
-----------------------------------	----

2-3-1-Caractères morphologiques.....	30
--------------------------------------	----

2-3-2-Colorations et caractéristiques biochimiques.....	30
2-3-3-Caractères chimiotaxonomiques.....	32
2-4-Classification des espèces.....	35
2-5-Taxonomie.....	37
3-Les actinomycètes : producteurs d'enzymes de biodégradation.....	39
3-1-Enzymes de biodégradation des composés organiques naturels.....	39
3-2-Enzymes de biodégradation des composés organiques de synthèse.....	42
3-3-Pouvoir dégradant des corynébacéries.....	44

Matériels et méthodes

1-Isolement de souches d'actinomycètes.....	48
1-1-Prélèvement des échantillons.....	48
1-2-Mesure du pH des échantillons.....	48
1-3-Milieux d'isolement.....	48
1-4-Méthode d'isolement.....	49
1-5-Prélèvement des colonies d'actinomycètes.....	49
1-6-Coloration de Gram.....	49
2-Conservation des souches d'actinomycètes isolées et purifiées.....	50
2-1-Gélose inclinée.....	50
2-2-Congélation des culture sporulées.....	50
3-Préparation des inoculums pour les tests de biodégradation et de préidentification...50	
4-Mise en évidence de la biodégradation des composés organiques complexes naturels	51
4-1-Biodégradation de la cellulose.....	51
4-2-Biodégradation de la pectine.....	52
5-Mise en évidence de la biodégradation des composés organiques de synthèse.....	52
5-1-Biodégradation du 2,5-xylénol et du 2,6-xylénol.....	53

5-2-Tolérance au 2,5-xylénol et au 2,6-xylénol.....	53
6-Préidentification des souches actives.....	54
6-1-Aspect macroscopique.....	54
6-2-Détermination des pigments mélanoides et des pigments diffusibles.....	54
6-3-Aspect microscopique.....	55
6-3-1-Technique de culture sur lame.....	55
6-3-2-Technique de culture sur lamelle.....	55
6-4- Détermination de l'acido-alcool-résistance.....	55
6-4-1- Coloration de Ziehl-Neelsen	56
6-4-2- Coloration de Ziehl-Neelsen modifiée.....	56
6-5- Caractéristiques biochimiques.....	57
6-5-1-Recherche de la catalase.....	57
6-5-2-Recherche de la Béta-Galactosidase.....	57
6-5-3-Recherche de la Nitrate-Réductase.....	57
6-6-Caractères physiologiques.....	58
6-6-1-Détermination de la température optimal de croissance.....	58
6-6-2-Détermination du pH optimum de croissance.....	58
6-6-3-Détermination du type respiratoire.....	59
6-6-4-Détermination de la mobilité.....	59
6-6-5-Détermination de la résistance au lysosyme.....	59

Résultats et discussion

1-Isolement des souches d'actinomycètes.....	61
1-1-Résultats.....	61
1-1-1-Caractéristiques des échantillons.....	61
1-1-2-Prélèvement des colonies d'actinomycètes.....	61
1-2-Discussion.....	62
2-Mise en évidence de la biodégradation des composés organiques complexes naturels.....	65

2-1-Mise en évidence de la biodégradation de la cellulose.....	65
2-1-1-Résultats.....	65
2-1-2-Discussion.....	67
2-2- Mise en évidence de la biodégradation de la pectine.....	69
2-2-1-Résultats.....	69
2-2-2-Discussion.....	72
3- Mise en évidence de la biodégradation des composés organiques de synthèse (le 2,5-xylénol et le 2,6-xylénol).....	74
3-1-Résultats.....	74
3-2-Discussion.....	76
4-Préidentification des souches actives.....	78
4-1-Résultats.....	78
4-2-Discussion.....	84
Discussion générale.....	90
Conclusion et perspectives.....	92
Références bibliographiques.....	94

Annexes

Introduction

Depuis plusieurs années, la dépollution et la valorisation des déchets agricoles et agroindustriels constituent un des thèmes de recherche principaux des microbiologistes.

Les dérivés cellulosiques et les substances pectiques sont la cible de plusieurs études, parce qu'ils sont rejetés annuellement en quantités considérables en tant que résidus agricoles ou par l'industrie du papier et des jus.

Des recherches de bioconversion des déchets cellulosiques par les **Cellulases** sont établies dans le but de les valoriser et de les transformer en un mélange de sucres plus intéressants sur le plan nutritif et gustatif, ou encore transformer ces mêmes sucres par fermentation en alcool utilisé dans différents domaines (**Ouled daoud et al., 2005**). La bioconversion est définie par l'utilisation de microorganismes pour la réalisation de réactions chimiques (**Bousseboua, 2002**).

Des études pour la valorisation des résidus issus de fruits riches en substances pectiques sont encore en cours, tel que le traitement des fibres végétales par les **Pectinases**, et qui peuvent être à ce fait utilisées dans les textiles et d'autres industries (**Nicemol Jacob et al., 2006**).

Par ailleurs, la croissance rapide de l'industrie chimique au cours des cent dernières années a modifié significativement notre mode de vie, ce qui a créé des problèmes tel qu'une pollution environnementale phénoménale. La mauvaise gestion des pesticides et des fertilisants dans les zones agricoles a modifié les conditions environnementales, non seulement la vie sauvage et aquatique est en danger mais les risques existent également pour les humains.

Une méthode pratique pour épurer les environnements contaminés est la biorémédiation ou dépollution biologique. La biorémédiation est définie par l'utilisation d'organismes vivants pour détruire les polluants environnementaux (**Perry et al., 2004**).

Divers microorganismes, notamment différentes espèces d'**actinomycètes** présentent des capacités de biodégradation des molécules organiques aussi variées que récalcitrantes (non biodégradables) (**Mc Carthy et al., 1992**).

Cette fonction de biodégradation des actinomycètes est due à la variété d'enzymes qu'elles peuvent synthétiser. En effet, les enzymes sont après les antibiotiques les plus importants produits des actinomycètes (**Lopes *et al.*, 1999**). L'action de ces enzymes conduits à la dégradation des nutriments et sources d'énergie plus ou moins complexes. Elles sont utilisées dans la dégradation des biomasses végétales et animales, dans l'industrie alimentaire et en biologie moléculaire (**William *et al.*, 1993**).

D'autres recherches ont montré que certaines espèces d'actinomycètes dégradent des composés organiques de synthèse qui sont en principe non biodégradable, tel que le phénanthrène et l'anthracène (**Moody *et al.*, 2001**) ainsi que le 2,6-xylénol hautement toxique et largement utilisé en industrie, et qui peut être dégradé par le genre *Mycobacterium* (**Jens *et al.*, 1989**).

Les actinomycètes constituent un groupe de microorganismes procaryotes Gram positifs, qui manifeste une diversité considérable depuis des formes bacillaires jusqu'à des formes filamenteuses, elles sont rencontrées dans tous les écosystèmes : sols polaires, sols désertiques, sols contaminés, sols cultivés, sols forestiers, débris végétaux ainsi que dans les eaux.

Le premier objectif de notre travail consiste en l'isolement de souches d'actinomycètes à partir d'écosystèmes riches en matières organiques (sol agricole, sol forestier), et la mise en évidence de leur capacité de biodégradation de composés organiques complexes, naturels (cellulose, substances pectiques) ou xénobiotiques (2,5-xylénol, 2,6-xylénol).

L'aspect morphologique des actinomycètes est variable sur milieux solides, la morphologie de leurs cultures varie beaucoup d'une souche à l'autre, en fonction de l'âge de la culture et du milieu utilisé. L'identification des différents genres dans un prélèvement quelconque peut se faire dans un premier temps par : l'aspect morphologique des colonies, des colorations cellulaires et des caractéristiques biochimiques. L'identification définitive repose sur le système chimiotaxonomique de Lechevalier, selon les schémas de Goodfellow et de Gordon.

Ainsi le second objectif de notre travail est la préidentification des souches d'actinomycètes pures ayant des capacités de biodégradation au moins sur l'un des substrats étudiés.

Etude bibliographique

1-Biodégradation (biodégradabilité) de la matière organique

1-1- Définition

Les composés organiques sont souvent classés comme biodégradables, persistants ou récalcitrants (**Grady, 1985**).

La définition émergente, proposée par de nombreux auteurs, de la biodégradation ou de la biodégradabilité se traduit par une action de dégradation d'un composé organique par des agents biologiques comme les bactéries, les champignons et les algues (**Xiu. Li et al., 2003 ; Rutot et Dubois, 2004**).

Autrement dit, c'est une dégradation biotique qui met en jeu l'action des microorganismes, qui grâce aux enzymes qu'ils excrètent peuvent utiliser les matières organiques comme sources de carbone et d'énergie conduisant à une décomposition du substrat au niveau moléculaire.

Si la biodégradation du substrat organique est totale, c'est-à-dire formation uniquement de produits inorganiques tels H_2O , H_2 , Cl^- ..., on parle de minéralisation (**Pelmont, 1993; Atlas, 1998**).

Le terme biotransformation implique la notion de transformation incomplète d'un substrat organique métabolisé qui n'aboutit donc pas forcément à son assimilation totale (**Pelmont, 1993**). Il peut s'agir par exemple d'une oxydation partielle du substrat qui se traduit par un rejet de produits intermédiaires (métabolites) dans le milieu.

La biodégradation peut avoir lieu en présence ou en absence d'oxygène, en milieu solide ou aqueux. Les facteurs d'environnement (température, humidité,...)

ainsi que la structure du substrat (liaisons chimiques, stéréochimie,...) sont des facteurs qui influencent le processus de biodégradation (**Van der zee *et al.*, 1994**).

1-2- Biodégradation de composés organiques complexes naturels

1-2-1- Généralités

Tous les composés organiques issus de la biosynthèse naturelle sont potentiellement biodégradables par les microorganismes. Leur biodégradabilité dépend avant tout des facteurs environnementaux suivant :

-Facteurs écologiques et physiologiques : il s'agit des caractéristiques biologiques et physico- chimiques du milieu qui influencent l'activité des microorganismes impliqués dans les mécanismes de biodégradation, citons le pH, la température, le potentiel redox, la quantité d'oxygène ou la disponibilité du récepteur d'électrons adéquat, les composés minéraux ou organiques nutritionnels présents dans le milieu, la présence de microorganismes inhibiteurs ou coopérateurs (**Manfé, 1993**).

-Facteurs structuraux : ils correspondent à la nature même des composés organiques, la biodégradabilité d'un composé organique dépend en effet de sa structure chimique et notamment de la présence de certaines molécules.

Pour chaque composé naturel, un ou plusieurs microorganismes sont capables de le décomposer en totalité ou en partie. Dans ce dernier cas, d'autres microorganismes dégradent les fragments ainsi formés.

Certains composés naturels de structures complexes sont difficiles à métaboliser et nécessitent des temps de décomposition très longs et l'action hydrolytique de populations microbiennes mixtes et hautement spécialisées, ainsi les polysaccharides végétaux (cellulose, hémicelluloses, lignine, pectine) constituant les parois sont parmi les composés organiques naturels les plus difficilement biodégradables (**Mustin, 1987**). Ces polysaccharides constituent une grande proportion des résidus agricoles et agro-industriels et forment une source très importante sur le plan économique.

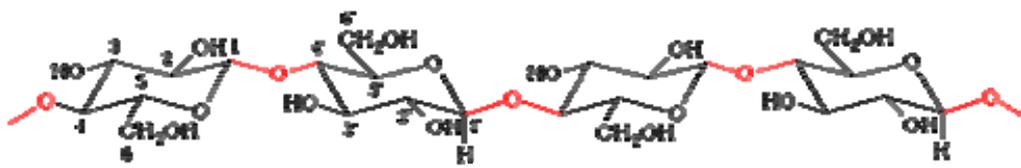


Figure N°1 : Structure moléculaire de la cellulose, d'après Odier (1985).

1-2-2- La cellulose

La cellulose est le matériel structural de base des parois cellulaires des végétaux supérieurs. À ce titre, c'est la macromolécule la plus abondante et la plus largement synthétisée sur terre.

C'est un homopolymère linéaire d'unités de D-glucopyranose liées par des liaisons β -1-4 dont le degré de polymérisation peut atteindre 14000 unités/molécule (**Figure N°1**).

La cellulose native est strictement insoluble dans l'eau (chaude ou froide) et très résistante aux dégradations chimiques (**Rouau et al., 1987**). Elle est insoluble dans les acides dilués (**Cho et al., 1997**). Son hydrolyse enzymatique est un phénomène relativement lent qui requiert l'action synergétique de plusieurs activités complémentaires (**Rouau et al., 1987**).

De nombreuses possibilités de liaisons hydrogènes entre polymères rendent la molécule stable, hydro-insoluble et même partiellement cristalline lorsque les molécules s'associent pour former des microfibrilles. La forme cristalline s'avère beaucoup plus résistante à la biodégradation que les formes amorphes.

La biodégradation de la cellulose est un des paramètres majeurs contrôlant le cycle du carbone sur terre. Elle est assurée par des microorganismes cellulolytiques qui secrètent à cet effet des enzymes aux propriétés très particulières : les **cellulases**.

La biodégradation de la cellulose a lieu aussi bien en aérobiose (par exemple à la surface du sol) qu'en anaérobiose (par exemple dans le rumen animal).

Parmi les bactéries cellulolytiques figurent des bactéries appartenant aux genres *Cellulomonas*, *Thermomonospora*, *Streptomyces*, *Ruminococcus* et *Clostridium*.

Ainsi, la cellulose constitue une source d'énergie renouvelable pratiquement inépuisable, pour cela des recherches de bioconversion des déchets cellulosiques sous l'action des **Cellulases** sont établies dans le but de les valoriser et de les transformer en un mélange de sucres plus intéressants sur le plan nutritif et gustatif, ou encore transformer ces mêmes sucres par fermentation en alcool utilisé dans différents domaines (**Ouled daoud et al., 2005**).

1-2-3-Les hémicelluloses

Les hémicelluloses constituent la matrice des parois qui assure la liaison des microfibrilles de cellulose entre elles par des liaisons hydrogènes. Ces composés forment un groupe mixte d'hétéropolymères linéaires et ramifiés comportant principalement cinq sucres monomériques : D-glucose, D-mannose, D-galactose, D-xylose et L-arabinose (**Fengel *et al.*, 1989, Kuhad *et al.*, 1997**). De manière générale les hémicelluloses s'associent entre elles par liaisons β -1-4 glucosidiques.

Elles sont insolubles dans l'eau chaude ou froide et les acides dilués chauds (**Cho *et al.*, 1997**). Cependant les hémicelluloses se distinguent de la cellulose par leur solubilité dans une base diluée. Leur biodégradation est beaucoup plus facile que la cellulose.

Les hémicelluloses font partie des substances ayant des effets critiques, c'est une source d'oligosaccharides, de sucres, d'alcools et d'autres composés organiques qui peuvent être libérés sous l'action des **hémicellulases (Rodionova *et al.*, 1992)**.

1-2-4-La lignine

La lignine est un hétéropolymère tridimensionnel provenant de la polymérisation oxydative de trois composés phénoliques : les alcools coniférylique, sinapylique et *p*-coumarilique (ou *p*-hydroxyphényl). (**Rouau *et al.*, 1987**).

Il se dépose au niveau des parois primaires et secondaires des cellules végétales, renforçant les microfibrilles de cellulose. Sa structure forme un polymère tridimensionnel insoluble, dense et résistant qui cimente les fibres entre elles, assure le transport de l'eau et confère au bois toute sa rigidité, peu sensible à la dégradation biologique (**Fengel *et al.*, 1989**).

Beaucoup de microorganismes parmi eux les actinomycètes, sont capables de produire l'**hèmepéroxydase**, enzyme de biodégradation de la lignine (**Masson *et al.*, 2001**).

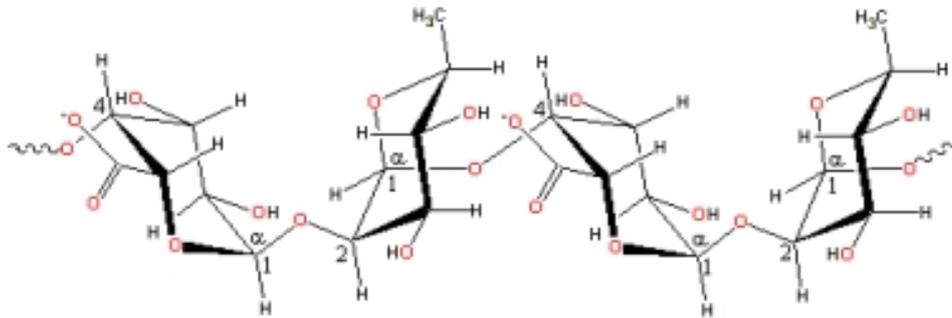


Figure N°2 : Structure moléculaire de la pectine (**Perez *et al.*, 2000**).

1-2-5- La pectine

La pectine est un polymère d'acide galacturonique présent principalement dans les parois cellulaires végétales. Il s'agit d'un polysaccharide anionique ramifié dont le poids moléculaire peut varier de 50 à 150 kilodaltons. Le squelette de la pectine est composé majoritairement d'unités d'acide D-galacturonique reliées par des liens glycosidiques α -(1-4) (**Figure N°2**).

Par rapport aux autres polysaccharides de la paroi végétale, la pectine est bien plus aisément biodégradée. Sa biodégradation est assurée par des microorganismes pectinolytiques tels que différentes souches d'actinomycètes (*Streptomyces*, *Thermomonospora*) qui secrètent à cet effet des enzymes aux propriétés très particulières : les **pectinases** (Agate *et al.*, 1962 ; Stutzenberger, 1987).

La dégradation complète des pectines est conduite par l'action combinée de trois activités pectinolytiques (pectine lyase, pectinestérase, polygalacturonase).

Les enzymes pectinolytiques sont largement utilisées dans l'industrie alimentaire tel que la clarification des jus de fruits, l'extraction des huiles et la fermentation du café et du thé. Des recherches pour le traitement des fibres végétales riches en pectine par les **Pectinases** pour leur utilisation dans les textiles et d'autres industries sont en cours de réalisation (Nicemol Jacob *et al.*, 2006).

1-3- Biodégradation des composés organiques de synthèse (Xénobiotiques)

1-3-1-Généralités

Les composés organiques d'origine biologique peuvent être dégradés par les microorganismes lorsque les conditions environnementales le permettent.

La situation est différente dans le cas des molécules organiques synthétisées par l'homme et qui sont étrangères à la nature.

Le caractère récalcitrant (non biodégradable) des molécules xénobiotiques est à mettre en relation avec l'existence ou non du ou des microorganismes possédant les enzymes capables d'attaquer cette molécule.

Divers bactéries et champignons sont capables de dégrader à différents degrés, des xénobiotiques dont certains sont totalement oxydés en CO₂, alors que d'autres ne peuvent être que partiellement dégradés.

Ils existent deux types de mécanismes ou métabolismes de dégradation de xénobiotiques : la biodégradation gratuite (dégradation par métabolisme) et le cométabolisme.

- **Biodégradation gratuite**

Dans ce cas le composé chimique est utilisé comme source de carbone et d'énergie par les microorganismes et sert pour leur croissance. Le succès de ce type de métabolisme dépend entre autre de la capacité du composé à induire la synthèse de l'enzyme requise. Cependant, il n'est pas rare pour des enzymes de se lier à des substrats contenant des groupements fonctionnels xénobiotiques analogues aux substrats naturels. Cela dépend du degré de similarité de la structure entre le composé xénobiotique et le substrat naturel (**Alexander, 1973**).

- **Cométabolisme**

Le Cométabolisme est défini comme la transformation d'un substrat ne servant pas à la division cellulaire (ne peut être utilisé comme source de carbone ou d'énergie) en présence obligatoire d'un substrat carboné (le co-substrat) (**Dalton et Stirling, 1982**).

Le cométabolisme demeure toutefois un phénomène complexe. En effet, cette complexité a été soulignée par **Golovleva (1980)** qui a trouvé que différents co-substrats (glucose, xylose, glycérol, acétate) avaient des effets différents sur la transformation du xylène par *Pseudomonas aeruginosa* .

Certaines de ces molécules xénobiotiques, ne sont biodégradables qu'après une éventuelle mutation et adaptation progressive de certains microorganismes.

Ces nouvelles capacités métaboliques qui apparaissent et se développent suppose que l'information génétique est portée par des éléments génétiques mobiles et échangeables : les plasmides.

Cet échange entre différentes souches appartenant à des espèces ou même à des genres bactériens différents permet une large dissémination du matériel génétique au sein de la population bactérienne. Ce remodelage du génome des microorganismes peut ainsi faire apparaître chez certaines espèces des combinaisons génétiques favorables, susceptibles d'assurer les relais enzymatiques nécessaires à la biodégradation (**Rousseaux, 2001**). Ces échanges peuvent contribuer à l'émergence de souches « hybrides » rassemblant l'ensemble des gènes nécessaires à la minéralisation du xénobiotique.

Parmi les xénobiotiques, les **pesticides** forment un groupe très important, incluant différents produits largement utilisés en agriculture : herbicides, insecticides, fongicides et nématicides.

1-3-2- les pesticides

Les pesticides sont destinés à protéger les plantes cultivées et les produits récoltés des attaques de champignons parasites, d'insectes, d'acariens, de rongeurs champêtres ou encore à détruire les adventices ou « mauvaises herbes ». Il faut également souligner l'existence des « biocides », pesticides réservés à des usages domestiques tels la destruction des rats, souris, blattes, mites ou encore la protection des bois contre les champignons ou les termites. Dans les années quarante, les premiers pesticides sont apparus sur le marché, avec des résultats très positifs quant à l'augmentation des rendements agricoles. Vingt ans plus tard, les premières accusations d'atteintes à la santé publique et à l'environnement commençaient à se faire entendre.

Au cours des dix dernières années, et suite à l'utilisation intensive des pesticides, des chercheurs ont imaginé divers procédés d'élimination de cette pollution, Parmi

Tableau N°1 : Propriétés physico-chimiques des xylénols.

Xylénols	2,3-xylénol	2,4-xylénol	2,5-xylénol	2,6-xylénol	3,4-xylénol	3,5-xylénol
Point d'ébullition (°C)	217,0	211,0	211,2	201,0	227,0	221,8
Point de fusion (°C)	25	24,5	74,5	49	62,5	65
Solubilité dans l'eau (mg/l à 25°C)	4770	7870	3450	6050	4760	4880

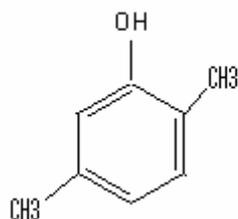


Figure N°3 : Structure moléculaire du 2,5-xylénol.

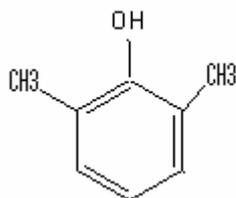


Figure N°4 : Structure moléculaire du 2,6-xylénol.

eux les traitements biologiques (biorémediation) sont susceptibles d'offrir un avantage économique important comparé aux procédés physico-chimiques classiques, souvent plus complexes dans leur réalisation et souvent onéreux. De nombreux microorganismes, utilisés en culture pure ou en culture mixte, ont été isolés à partir de milieux pollués, et testés pour leur capacité à métaboliser divers polluants, aussi bien dans le sol que dans l'eau.

Parmi les pesticides représentant un danger pour l'environnement et dont des recherches sont en cours pour leur élimination, les **xylénols** dotés de propriétés fongicides, bactéricides, nématicides et largement utilisés en industrie.

- **Les xylénols**

En **1982**, l'agence américaine pour la protection de l'environnement (E.P.A) a publié une liste de **129** produits considérés comme polluants organiques. Sur cette liste figurent les diméthylphénols (**les xylénols**) (**Tableau N°1**), largement utilisés dans l'industrie.

Ils sont utilisés comme intermédiaires dans la fabrication de plusieurs produits industriels comme les résines, les antioxydants, les désinfectants et les vernis. Ces produits entrent aussi dans la composition des insecticides utilisés dans l'industrie de préservation du bois. Les six isomères de la famille des xylénols (2,3-xylénol, 2,4-xylénol, 2,5-xylénol, 2,6-xylénol, 3,4-xylénol, 3,5-xylénol) représentent 35 % en poids de la composante phénolique des insecticides (le mélange étant composé de 85 % d'hydrocarbures aromatiques polycycliques, de 10 % de composés phénoliques et de 5 % de composés hétérocycliques de l'azote, du soufre ou de l'oxygène) (**Callahan et al., 1982 ; Goerlits et al., 1985**).

Plusieurs voies de dégradation sont envisageables pour ces polluants, parmi ces voies le processus de biodégradation. Des études antérieures ont montré que parmi les six isomères structuraux, cinq sont métabolisés par des souches de *Pseudomonas* (**Chapman, 1972**).

La dégradation du **2,3** et **3,4 xylénol** par deux souches de *Pseudomonas Putida* est initiée par l'hydroxylation du noyau benzène en 3,4-diméthyl catéchol (1,2-dihydroxy-3,4-diméthylbenzène), suivie par un mécanisme de fission de ce noyau (**Feist et al., 1969**).

Par contre la première étape de dégradation du **2,4-xylénol** est l'oxydation du groupement méthyle en groupement hydroxyle suivie par l'attaque du deuxième groupement méthyle (**Chapman et al., 1968**).

Le 2,5-xylénol (**Figure N°3**) et 3,5 xylénol sont métabolisés par *Pseudomonas alcaligenes* **25x** et *Pseudomonas putida* **35x**, par l'oxydation initiale de l'un des groupements méthyle, suivie par l'hydroxylation du noyau benzène (**Hopper and Kemp, 1980**).

Peu d'informations sont connus sur la biodégradation du 2,6-xylénol (**Figure N°4**), tel que son utilisation par la souche *Mycobacterium* sp. DM1 comme seule source de carbone et d'énergie (**Jens et al., 1989**).

1-4- Techniques d'évaluation de la biodégradabilité des substances organiques

Il existe actuellement plusieurs analyses de laboratoire permettant d'évaluer la biodégradabilité (**Pagga, 1997**). Le principe général de ces techniques est basé sur les observations des mécanismes de biodégradation.

La biodégradation, en milieu aérobie comme en milieu anaérobie, est une succession de réactions bio-physico-chimiques induites par la présence des microorganismes.

Les techniques et les tests développés reposent sur le suivi d'un paramètre de ces réactions. Celui-ci doit être choisi suffisamment significatif de l'avancement de la réaction, c'est à dire présenter une relative variabilité au cours de la réaction et être suffisamment important pour être accessible et facilement décelable par les méthodes de mesure employées. Cela peut être soit un réactif dont on suit la **disparition**, soit un **produit de la réaction**.

- Disparition : évaluation de la **biodégradation primaire** sans savoir ce que devient le substrat.
- Formation d'un produit ultime tels que CO₂ ou CH₄ : évaluation de la **biodégradation ultime**.

En milieu **aérobie**, les paramètres couramment suivis sont :

- la consommation d'oxygène : c'est le signe d'une activité respiratoire donc du métabolisme des microorganismes dégradant la matière organique. On peut suivre la disparition de l'oxygène par respirométrie ou par manométrie en repérant les variations de pression à l'intérieur de la fiole d'essai.

- la production de CO₂ : les processus respiratoires engendrent une production de dioxyde de carbone. Par essai manométrique ou volumétrique, on peut également suivre la variation de CO₂ dans la fiole.

- la production de biomasse : les microorganismes utilisent les substrats organiques pour se multiplier. En parvenant à quantifier la production de biomasse résultant de cette activité, c'est-à-dire le nombre d'individus (cellules) ou la masse d'individus en fonction de la durée d'incubation.

En milieu **anaérobie**, on considérera comme indicateur de biodégradation :

- la production de biogaz : les réactions de métabolisme anaérobie s'accompagnent de rejet de dioxyde de carbone et de méthane. En mesurant la quantité produite (par méthode manométrique), on peut quantifier la biodégradation du substrat testé.

- la production de biomasse.

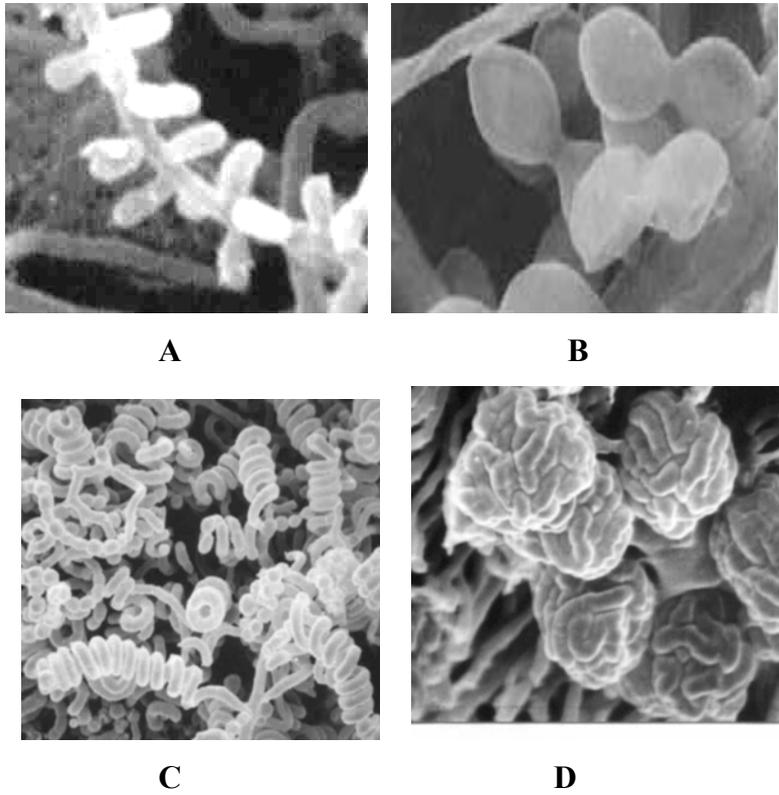


Figure N°5 : Exemples de genres actinomycétales photographiés en microscopie électronique. Photos dans l'Atlas des actinomycètes 1997, (Joachin, 2002).

- A :** *Saccharomonospora viridis*.
- B :** *Actinobispora*.
- C :** *Streptomyces*.
- D :** *Actinoplane*.

2- Les actinomycètes : agents de biodégradation dans la nature

2-1- définition, caractéristiques principales et écologie

Les actinomycètes sont des bactéries dont la croissance donne lieu à des colonies circulaire (**Eunice et Prosser, 1983**) constituées d'hyphes (**Figure N°5**), c'est-à-dire de filaments qui irradient par croissance centrifuge tout autour du germe qui leur a donné naissance (**Gottlieb, 1973 ; Lechevalier et Lechevalier, 1981 ; Eunice et prosser, 1983**).

Les actinomycètes se situent dans l'ordre des actinomycétales (**Mariat et Sebald, 1990**), sont des procaryotes à structure de bactéries à Gram positif (**Williams *et al.*, 1993 ; Sanglier et Trujillo, 1997**) dont le coefficient de chargaff (G+C%) est supérieur à 55 %, généralement compris entre 60 et 75 % (**Ensign, 1978 ; Larpent et Sanglier, 1989 ; Chun *et al.*, 1997**).

Elles tendent à croître lentement comme des filaments ramifiés (0,5-1,0 µm de diamètre) (**Eunice, 1983**), le diamètre des hyphes est plus petit que celui des champignons (**Gottlieb, 1973**).

Leur croissance est plus lente que celle des autres bactéries ; le temps de génération moyen est d'environ 2 à 3 heures (**Ottow et Glathe, 1968 ; Larpent et Sanglier, 1989**).

D'autre part, les actinomycètes rassemblent des bactéries d'une extrême diversité. Physiologiquement, il est possible de distinguer les formes aérobies qui sont de très loin les plus nombreuses et des types anaérobies trouvés primitivement chez les animaux et l'homme. Les actinomycètes préfèrent un pH neutre ou peu alcalin, ils sont généralement mésophiles, d'autres sont thermophiles tolèrent des températures avoisinant 50°C et peuvent aller jusqu'à 60°C (**Omura, 1992**).

En générale, les actinomycètes sont des hétérotrophes, mais plusieurs espèces sont capables aussi de croissance chimioautotrophe (**Ensign *et al.*, 1993**).

Tableau N°2: Fréquence des divers genres d'actinomycètes dans le sol d'après l'étude de 5000 échantillons issus de 16 sols différents (**Lechevalier et Lechevalier, 1967**).

Genres	%
<i>Streptomyces</i>	95,34
<i>Nocardia</i>	1,98
<i>Micromonospora</i>	1,40
<i>Thermomonospora</i>	0,22
<i>Actinoplanes</i>	0,20
<i>Microbispora</i>	0,18
<i>Mycobacterium</i>	0,14
<i>Streptosporangium</i>	0,10
<i>Actinomadura</i>	0,10
<i>Micropolyspora</i>	0,10
<i>Pseudonocardia</i>	0,06
<i>Microellobosporia</i>	0,04

La morphologie des différents groupes d'actinomycètes est très variable (**Gottlieb, 1973**), on observe des formes multiples, depuis la cellule coccoïde ou bacillaire jusqu'à un mycélium complexe générateur de spores enveloppées dans un sporange chez certains genres.

Les actinomycètes sont des microorganismes très ubiquitaires que l'on rencontre sur tous les substrats naturels courants (**Lacey, 1973 ; Porter, 1971 ; Waksman, 1959 ; Williams et al., 1984**).

Bien que les premières souches d'actinomycètes aient été isolées de sources humaines et animales respectivement par **COHN** en **1875** et **NOCARD** en **1888**, c'est le sol qui en est certainement le réservoir le plus riche, réservoir à partir duquel ces microorganismes peuvent envahir de nombreux biotopes.

- sols

Les actinomycètes sont largement répandus dans tous les sols à l'exception des sites exposés à des conditions trop extrêmes. Ils sont surtout présents dans la couche comprise entre la surface du sol et jusqu'à 2 m de profondeur. Ils produisent des substances spécifiques telles que la géosmine et le 2-méthyl isobornéol qui sont responsables de l'odeur d'humus caractéristique des sols (**Omura, 1992 ; Zaitlin et al., 2003**).

Leur nombre varie dans de fortes proportions selon les cas mais il est courant dans des terres fertiles de dénombrer 10^6 unités formatrices de colonies par gramme de terre sèche.

Les actinomycètes sont généralement moins nombreux que les autres bactéries mais plus nombreux que les champignons.

Leurs proportions par rapport aux autres microorganismes oscillent entre 10 et 50 %. Les genres *Streptomyces*, *Nocardia* et *Micromonospora* sont les plus fréquents, le genre *Streptomyces* couvre à lui seul 95 % des souches d'actinomycètes isolées (**Tableau N°2**).

- Milieux marins

L'opinion selon laquelle des actinomycètes peupleraient normalement le milieu marin est très controversée. Selon les uns, les souches d'actinomycètes isolées de tels milieux ne seraient que des formes terricoles adaptées à la salinité de l'eau de mer ; selon d'autres, il existerait bien une flore d'actinomycètes propre aux sédiments marins caractérisée par sa barotolérance, son halophilie et une température optimale faible ; ainsi, certaines souches nocardioformes isolées à plus de 2000m de profondeur se développent sous les pressions hydrostatiques de 500 bars en présence d'eau de mer à 18°C (**Weyland, 1981**).

- Eaux douces

Les actinomycètes sont bien représentés dans ce milieu d'où l'on peut facilement isoler des souches de *Micromonospora*, d'*Actinoplanes* et de *Streptosporangium*. C'est essentiellement dans des sédiments des fonds fluviaux ou lacustres que ceux-ci sont présents où ils jouent un rôle important dans la décomposition des débris végétaux et donnent à l'eau son odeur de terre et sa flaveur.

- Air

L'air constitue pour les actinomycètes, non pas un habitat, mais un moyen de transport. Les spores des actinomycètes sont des contaminants importants de notre environnement. L'exposition à ces derniers peut causer des effets néfastes sur la santé (**Gazenko *et al.*, 1998 ; Reponen *et al.*, 1998 ; Suutari *et al.*, 2002**).

- Les composts

Le compostage est défini comme étant la décomposition biologique thermophile, en présence d'oxygène et dans des conditions contrôlées, de déchets organiques collectés séparément, sous l'action de micro et macroorganismes, afin de produire du compost. Le compost, produit final du compostage est composé pour l'essentiel de la matière organique de type humique stable et de composés minéraux (**Mustin, 1987**).

Tableau N°3 : Exemples d'actinomycètes impliqués dans le processus de compostage.

Espèces	Références
<i>Actinobifida chromogena</i>	Lacey (1973).
<i>Micropolispora faeni</i>	Lacey (1973).
<i>Pseudonocardia thermophilia</i>	Fergus (1964).
<i>Streptomyces</i>	
<i>S.Thermoviolaceus</i>	Fergus (1964).
<i>S.Thermofuscus</i>	Makawi (1980).
<i>S.Thermovulgaris</i>	Fergus (1964).
<i>Thermoactinomyces</i>	
<i>T.Vulgaris</i>	Waksman (1939b).
<i>T.Sacchari</i>	Lacey (1973).
<i>Thermomonospora</i>	
<i>T.Curvata</i>	Fergus (1964).
<i>Thermomonospora.sp</i>	Lacey (1973).

Des actinomycètes sont isolés des composts (**Tableau N°3**), il s'agit de genres thermophiles tels que *Thermoactinomyces*, *Sacharomonospora* et d'autres thermotolérants tel que *Microbispora*, *Micropolyspora*, *Pseudonocardia* (**Ensign et al., 1993 ; Lacey, 1997 ; Song et al., 2001**).

Les actinomycètes sont actifs dans les derniers stades du compostage. Ils se sont spécialisés dans l'attaque des structures plus résistantes comme la cellulose, l'hémicellulose et la lignine.

- les végétaux, l'animal et l'homme

Dans la distribution naturelle des actinomycètes, il faut ajouter les végétaux, les animaux et l'homme pour lesquels certains sont pathogènes. Parmi les exemples les mieux connus, il faut citer :

-*Streptomyces scabies*, responsable de la gale de pomme de terre ;

-*Actinomyces bovis*, responsable d'une actinomycose chez le bétail ;

-*Mycobacterium tuberculosis* et *Mycobacterium leprae*, agents des maladies correspondantes.

-*Nocardia asteroides*, responsable de la nocardiose humaine ;

-*Micropolyspora faeni*, responsable d'une pneumonie allergique chez l'homme.

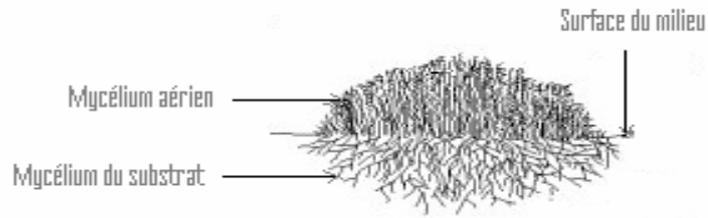


Figure N°6 : Croissance d'une colonie d'actinomycètes sur milieu solide.

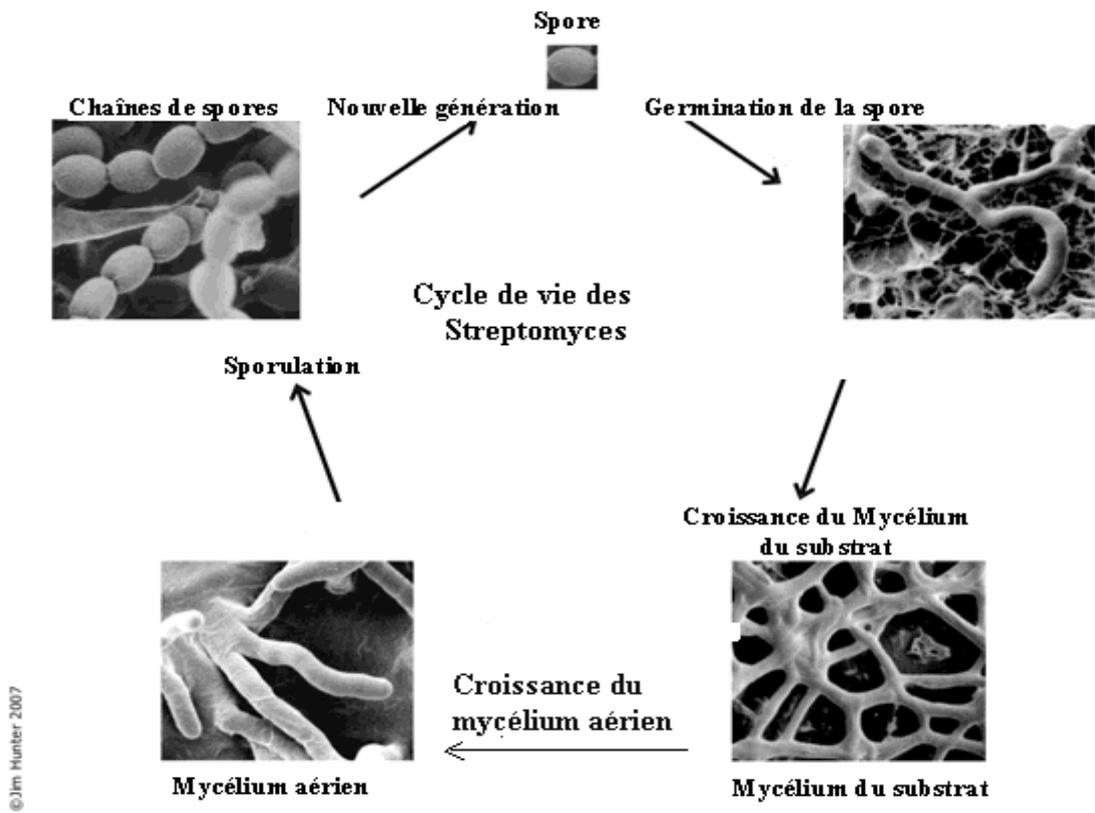


Figure N°7 : Cycle de vie des *Streptomyces*.

2-2- Biologie du développement (Figures N°6 et 7)

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 différenciées développent sur un milieu gélosé une masse d'hyphes mycéliens répartis en deux couches distincts : 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.

2-2-1- 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.

Chez quelques genres comme *Rhodococcus*, il n'y a pas de véritable mycélium mais seulement croissance d'une propagule originelle formant un filament plus ou moins long se fragmentant ensuite en petites unités et donnant parfois naissance à des ramifications élémentaires. Cette fragmentation des hyphes est présente chez des genres généralement dépourvus de spores ou n'en produisant qu'un petit nombre.

Les sporoactinomycètes produisent un véritable mycélium du substrat, ramifié ou non fragmenté. Des parois transversales peuvent être formées pour isoler les parties les plus âgées du mycélium. Des spores sont formées sur le mycélium du substrat chez des genres comme *Micromonospora*, *Micropolyspora*, et parfois *Streptomyces*.

La largeur des filaments mycéliens varie de 0,5 à 2 µm. Leur ramification est très souvent monopodiale mais parfois dichotomique ou verticillée.

Le mycélium du substrat est ancré dans le support solide ou il puise ses nutriments. Sa croissance, de type apicale, est analogue à celle observée en milieu liquide.

Le mycélium aérien, appelé aussi mycélium secondaire, est formé d'hyphes dressés sur le mycélium du substrat. Ces hyphes aériens sont plus épais et beaucoup moins ramifiés que les hyphes du substrat. Ils sont en général pigmentés et enfermés dans une enveloppe externe hydrophobe.

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

2-2-2- Formation des spores

Les spores d'actinomycètes ont une fonction de dispersion et de survie dans des conditions défavorables de croissance végétative. Les divers types de spores des actinomycètes peuvent être classés en deux groupes principaux selon leur mode de formation : exospores et endospores. Les exospores sont le type le plus fréquent, elles sont formées par septation d'hyphes existants et séparation des éléments obtenus. Les

endospores sont produites par des actinomycètes thermophiles, elles sont issues d'une réorganisation cytoplasmique et de la formation d'une nouvelle paroi dans l'hyphe existant.

La viabilité des spores est fonction de leur type : des endospores de *Thermoactinomyces* ont survécu plusieurs centaines d'années dans des sédiments lacustres à 5 °C. Comparativement, des exospores sèches de *Streptomyces* survivent 20 à 30 ans comme les conidies de champignons.

La thermorésistance des endospores est nettement supérieure à celle des exospores en milieu sec ou humide (**Leveau et Buix, 1993**).

La sporulation est contrôlée par des facteurs extérieurs aux microorganismes et par des facteurs propres à ceux-ci. Parmi les éléments extérieurs favorisant la sporulation, nous retiendrons principalement : la dessiccation, une concentration élevée en gélose, le glycérol comme source de carbone, l'urée comme source d'azote, l'addition de carbonate de calcium et d'extrait de sol, la présence de magnésium, de fer et de manganèse, et un pH légèrement alcalin voisin de 7,5.

Les facteurs propres aux microorganismes sont d'ordres génétiques et biochimiques. De nombreux travaux ont mis en évidence des biorégulateurs codés par des gènes chromosomiques et plasmidiques influant de manière complexe sur la sporulation ainsi que sur la biosynthèse de métabolites secondaires (**Beppu, 1986, 1992 ; Grafe *et al.*, 1984 ; Khokhlov, 1986 ; Vitalis *et al.*, 1986**).

2-2-3- La germination des spores

A l'issue d'une dormance dont la durée est fonction du type et des conditions du milieu, les spores germent pour donner naissance à un mycélium.

On distingue généralement quatre étapes : l'activation, l'initiation, l'émergence du tube de germination et la croissance de celui-ci.

Les exospores dont la dormance est de type exogène, sensible au milieu, germent après activation par un choc thermique qui peut être par exemple de 50 °C chez

S. viridochromogenes, suivie d'une initiation en présence de L-alanine, d'adénosine, d'acide glutamique, d'acide para-aminobenzoïque, d'ions Ca²⁺, Mg²⁺ et de CO₂. L'oxydation des réserves de tréhalose fournit l'énergie nécessaire.

Les endospores de *Thermoactinomyces* ne germent dans des conditions de milieu favorable qu'avec une activation spécifique de nature physique. Un refroidissement à 20 °C de 2 à 48 h est nécessaire pour permettre aux spores de *Thermoactinomyces vulgaris* de répondre ensuite au choc thermique de 55 °C inducteur de la germination (**Leveau et Buix, 1993**).

2-2-4- Structures particulières

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

Ainsi les **sclérotés** trouvés chez *Chainia* sont constitués par une masse d'hyphes cloisonnés dont les vacuoles sont chargées de triglycérides et d'acides gras ramifiés.

Les **Synnemata**, appelés également **corémies** sont des assemblages compacts d'hyphes dressés, parfois fusionnés et portant des conidies apicales ou latérales. Cette structure est caractéristique du genre *Actinosynnema*.

Les **sporangies** sont des sacs contenant des spores.

Les **conidies** sont des spores asexuées qui peuvent avoir plusieurs organisations :

- une seule conidie tel que le genre *Micromonospora* ;
- une paire de conidies chez le genre *Microbispora* ;
- chaînes courtes de conidies formées d'un nombre inférieur ou égale à 20 spores par chaîne ;
- longues chaînes de conidies formées d'un nombre plus de 20 spores par chaîne ;
- conidies rassemblées dans des synnemata (spores mobiles et qui peuvent être libérées).

2-3- Détermination des genres

La distinction entre les divers groupes d'actinomycètes est actuellement établie sur des critères morphologiques, physiologiques, physique et biochimiques.

Les critères physiologiques se limitent au type de métabolisme oxydatif ou fermentatif. Le principal caractère physique considéré est la sensibilité des spores à la chaleur. Les caractères morphologiques et biochimiques sont les plus importants.

Tableau N°4: Caractères d'identification présomptive des *Nocardia* et des autres genres d'actinomycètes apparentés au genre *Nocardia* (Carlotti *et al.*, 1994, Boiron *et al.*, 1993).

	<i>Nocardia</i>	<i>Rhodococcus</i>	<i>Mycobacterium</i>	<i>Gordonia</i>	<i>Tsukamurella</i>
Mycélium aérien	+	-	-	-	-
ONPG	+	-	-	-	+
Nitrate réductase	+	V	+	+	-
Résistance au lysozyme	R	S	V	S	R

*: *N. seriolae* et *N. crassostreae* ne forment pas de mycéliums aériens ;

S : Sensible ; **R** : Résistant ; **V** : Variable ; **+** : Présence de l'enzyme ; **-** : Absence de l'enzyme ;

ONPG : Ortho-Nitrophényl-Béta-galactosidase.

2-3-1- Caractères morphologiques

Les caractères morphologiques principalement utilisés dans la classification des actinomycètes sont :

- La présence, l'importance et la disposition des hyphes du mycélium du substrat ou du mycélium aérien.

- La présence de spores, leur mobilité, leur disposition sur les hyphes et leurs formes.

- La présence de structures particulières comme les sporanges, les sclérotites ou synnemata (**Schofield et Schaal, 1981 ; Demain et Solomon, 1985**).

Mais bien qu'il soit parfois possible de classer une souche sur la base de critères morphologiques tout à fait évident, ceux-ci ne suffisent pas pour établir une détermination correcte et il est indispensable de considérer d'autres caractères (**Lechevalier et Lechevalier, 1980**).

2-3-2- Colorations et caractéristiques biochimiques (Tableau N°4)

Certains groupes d'actinomycètes tels les nocardio-bactéries ont une paroi cellulaire très riche en lipides et en cires de 60 à 90 carbones appelées acides mycoliques. Ces acides sont des acides gras complexes et leur présence ainsi que celle d'autres lipides à l'extérieur du peptidoglycane rendent les bactéries positives à la coloration de **Ziehl Neelsen (acido-alcool-résistance)**.

L'acido-alcool-résistance est caractéristique du genre *Mycobacterium*. L'acido-alcool-résistance des *Nocardia* est partielle avec la technique modifiée de **Kinyoun** ou de **Ziehl Neelsen**.

A côté de ces colorations, divers tests simples ont été proposés pour distinguer les *Nocardia* des *Rhodococcus*, *Tsukumurella* et *Gordonia*, comme l'analyse de la sensibilité au lysosyme, ainsi que la recherche d'une activité B-galactosidase (enzyme permettant l'hydrolyse du lactose en glucose et galactose) et d'une nitrate réductase (enzyme qui catalyse la réaction de réduction des nitrates).

Tableau N°5 : Types pariétaux en fonction des constituants distinctifs majeurs des parois cellulaires (Lechevalier et Lechevalier, 1980).

Type pariétal	Constituants distinctifs majeurs	Exemples de genres
I	LL-DAP, glycine	<i>Streptomyces</i>
II	méso-DAP, glycine	<i>Micromonospora,</i>
III	méso-DAP	<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 diaminobutyrique

Tableau N°6 : Types pariétaux et types glucidiques cellulaires des actinomycètes aérobies à méso-DAP (Lechevalier et Lechevalier, 1980).

Type pariétal	Constituants pariétaux distinctifs majeurs	Type glucidique cellulaire (Spectre glucidique)	Constituants glucidiques caractéristiques
II	Glycine	D	Xylose, Arabinose
III	Aucun	B	Madurose
		C	Aucun ou Rhamnose
IV	Arabinose, galactose	A	Arabinose, galactose

2-3-3- Caractères chimiotaxonomiques

L'étude des constituants majeurs de la paroi cellulaire des actinomycètes constitue un outil pratique pour leur taxonomie (**Stanek et Roberts, 1974 ; Lechevalier et al., 1977**), elle permet de répartir ces microorganismes en huit types dont les plus importants sont les quatre premiers.

o Les amino acides

La paroi cellulaire des actinomycètes est composée soit d'une :

-glycoprotéine contenant de la **lysine** ; ce type de paroi est rencontré chez les formes fermentatives, habitants naturels des cavités de l'homme et des animaux, illustrées par le genre ***Actinomyces*** (**Lechevalier et Lechevalier, 1985**).

-glycoprotéine contenant le plus souvent l'**acide LL- 2,6 diaminopimélique (DAP)** ; ce type de paroi se rencontre chez les formes oxydatives retrouvées essentiellement dans le sol, tel que les ***Streptomyces***.

Les actinomycètes avec des parois cellulaires de type I possèdent principalement de l'acide diaminopimélique de forme LL, cependant que la forme méso de ce même acide est caractéristique des types II, III et IV (**Tableau N°5**).

La glycine est également présente en quantité importante chez les ***Streptomyces*** et les ***Actinoplanetes*** (**Larpent et Sanglier, 1989**).

o Les sucres

La présence ou l'absence de quatre sucres (arabinose, galactose, xylose et madurose) dans les hydrolysats acides de cellules entières permet de classer les actinomycètes de type pariétal II, III et IV contenant du méso-DAP (**Tableau N°6**). Sur cette même base, il est aussi possible de répartir en deux sous-groupes les actinomycètes de type pariétal III selon la présence ou l'absence de Madurose.

○ Les lipides

Les lipides taxonomiquement important peuvent être représentés par trois groupes : les lipides polaires, les ménaquinone et les acides mycoliques.

-Les lipides polaires : les plus communs chez les actinomycètes sont les phospholipides d'origine membranaire, **(Lechevalier et Lechevalier, 1980)**.

-Les ménaquinones : les ménaquinones sont des lipides ayant dans leur structure un noyau quinone méthylé et une chaîne carboné aliphatique composée d'unités isoprènes. Ils sont classés suivant le nombre de ces unités et le degré d'hydrogénation (saturation) de la chaîne **(Collin et al., 1977)**.

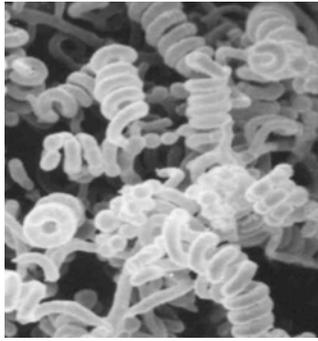
Par exemple, le genre *Planomonospora* se caractérise par une ménaquinone **MK9 (H2)** : ménaquinone avec neuf unités isoprènes dont deux hydrogénées.

Les ménaquinones ont apporté un complément intéressant en permettant de confirmer les résultats obtenus sur les phospholipides.

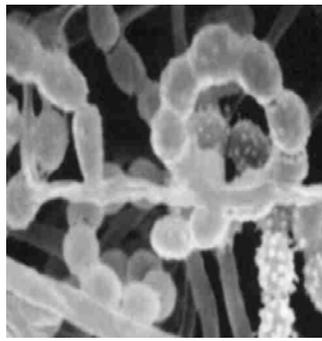
-Les acides gras : sont des chaînes qui peuvent être droites ou ramifiées, saturées ou insaturées. Le nombre d'atomes de carbone est caractéristique du genre. Les acides gras rencontrés chez les actinomycètes sont , soit des molécules de 12 à 20 atomes de carbone, soit un groupe d'acides mycoliques de 20 à 90 atomes de carbone, caractéristique des genres tels que *Mycobacterium*, *Nocardia* et *Rhodococcus*.

○ Les acides nucléiques

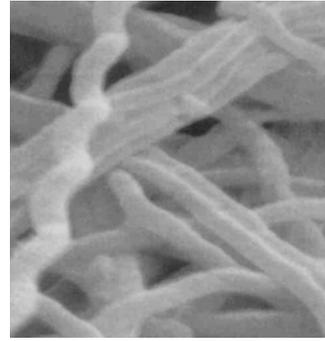
Parmi les caractères important non seulement dans la reconnaissance des genres mais aussi des familles d'actinomycètes, il y a la détermination du coefficient de chargaff (G+C)% et le séquençage de l'ADN ribosomique, lesquels ont permis de tracer toute la phylogénie des actinomycètes. La détermination du coefficient de chargaff à permis de reconsidérer la définition des actinomycètes dont l'ADN contient un pourcentage de G+C supérieur à 55%. Le sequençage de l'ADN ribosomique permet de différencier nettement les genres entre eux.



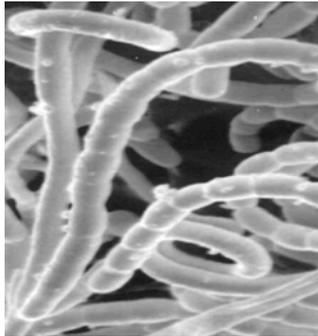
Spires compactes



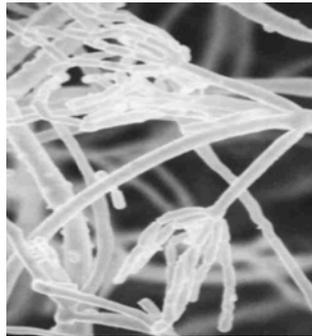
Spires ouvertes



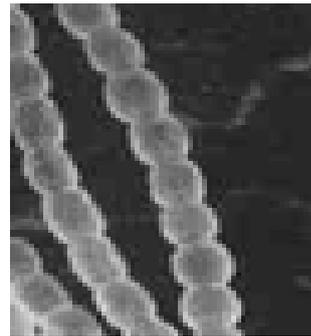
Flexibles



Monoverticilles avec
spires



Biverticille sans
spires



Droites

Figure N°8 : Exemples de formes de chaînes de spores des actinomycètes ;
Photos dans l'Atlas des actinomycètes 1997 (**Joachin, 2002**).

2-4- Classification des espèces : Exemple du genre *Streptomyces*

La clé de détermination des espèces de *Streptomyces* la plus employée est celle du *Bergey's Manual* ; elle fait largement appel aux travaux de l'«International *Streptomyces* Project ». Cette clé se fonde sur les caractères principaux suivants :

-La couleur du mycélium aérien sporulé avec 7 classes de couleur : blanc, gris, jaune, rouge, bleu, vert et violet.

-La forme des chaînes de spores (**Figure N°8**) :

*Série Rectus Flexibilis lorsque les chaînes sont droites ou flexueuses ;

*Série Spira lorsque les chaînes sont hélicoïdales ;

-La production de pigments mélanoïdes bruns à noirs ;

-L'ornementation de la paroi des spores : lisse, verruqueuse, échinulée ou chevelue ;

-La capacité d'utiliser certaines sources de carbone pour se développer : D-glucose, D-xylose, L-arabinose, L-rhamnose, D-fructose, D-galactose, raffinose, D-mannitol, inositol et saccharose.

Toutefois, la description d'une souche peut nécessiter l'étude d'autres caractères. Une panoplie d'environ 120 caractères morphologiques et biochimiques supplémentaires est alors à la disposition des taxonomistes. 75 de ces caractères correspondent à la recherche de l'utilisation de nombreuses sources de carbone et d'azote (**Pridham et Gottlieb, 1948**). La plupart des autres caractères traduisent le degré de développement et la morphologie des souches sur divers milieux complexes ou synthétiques (**Waksman, 1950**).

Rappelons enfin que ces méthodes de classification évoluent rapidement et qu'au niveau subgénérique la taxonomie numérique devrait permettre une définition plus cohérente des espèces appartenant à divers genres d'actinomycètes dont en particulier le genre *Streptomyces* (**Locci, 1989**).

Phylum *Actinobacteria*

Classe *Actinobacteria*

S/C	<i>Acidimicrobidae</i>	<i>Rubrobacteridae</i>	<i>Coriobacteridae</i>	<i>Sphaerobacteridae</i>	<i>Actinobacteridae</i>
-----	------------------------	------------------------	------------------------	--------------------------	-------------------------

S/C	<i>Actinobacteridae</i>				
Ordres	<i>Bifidobacteriales</i>			<i>Actinomycetales</i>	

Ordre *Actinomycetales*

S/O <i>Actinomycineae</i>	S/O <i>Micrococcineae</i>	S/O <i>Corynebacterineae</i>	S/O <i>Micromonosporineae</i>	S/O <i>Propionibacterineae</i>
Famille <i>Actinomycetaceae</i>	Familles <i>Micrococcaceae</i> <i>Bogoriellaceae</i> <i>Rarobacteraceae</i> <i>Sanguibacteraceae</i> <i>Brevibacteriaceae</i> <i>Cellulomonadaceae</i> <i>Dermabacteraceae</i> <i>Dermatophilaceae</i> <i>Dermacoccaceae</i> <i>Intrasporangiaceae</i> <i>Jonesiaceae</i> <i>Microbacteriaceae</i> <i>Beutenbergiaceae</i> <i>Promicromonosporaceae</i>	Familles <i>Corynebacteriaceae</i> <i>Dietziaceae</i> <i>Gordoniaceae</i> <i>Mycobacteriaceae</i> <i>Nocardiaceae</i> <i>Tsukamurellaceae</i> <i>Williamsiaceae</i>	Famille <i>Micromonosporineae</i>	Familles <i>Propionibacteriaceae</i> <i>Nocardioidaceae</i>
S/O <i>Pseudonocardinea</i>	S/O <i>Streptomycineae</i>	S/O <i>Streptosporangineae</i>	S/O <i>Frankinea</i>	S/O <i>Glicomycineae</i>
Familles <i>Pseudonocardiaceae</i> <i>Actinozynnemataceae</i>	Famille <i>Streptomycetaceae</i>	Familles <i>Streptosporangiaceae</i> <i>Nocardiopsaceae</i> <i>Thermomonosporaceae</i>	Familles <i>Frankiaceae</i> <i>Geodermatophilaceae</i> <i>Microsphaeraceae</i> <i>Sporichthyaceae</i> <i>Acidothermaceae</i> <i>Kineosoriaceae</i>	Famille <i>Glycomycetaceae</i>

S/C : sous-classe, S/O : sous-ordre.

Figure N°9: La classification hiérarchique de la classe *Actinobacteria* basée sur l'analyse phylogénétique de l'ADNr / l'ARNr 16S (Garrity *et al.*, 2004).

2-5- Taxonomie

La taxonomie des actinomycètes a beaucoup évolué au cours des vingt à trente dernières années en même temps qu'évoluait le nombre de genres d'actinomycètes.

L'ordre des actinomycètes qui comptait 5 genres en 1948, 9 en 1958, en comprenait 37 en 1974 selon la 8^{ème} édition du *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (Gottlieb, 1974).

En 1989, l'application de critères chimiotaxonomiques a permis de répartir les actinomycètes en sections (de 26 à 33) sur la base de caractères morphologiques et biochimiques.

Selon la classification présentée dans le *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* édité en 1994, les actinomycètes sont répartis en 8 groupes (de 22 à 29) avec l'introduction de nouveaux genres et avec une division plus précise du groupe (22) des *Nocardioformes* en 4 sous-groupes et du groupe (26) des *Maduromycetes* en 2 sous-groupes.

En 1997, **Stackebrandt *et al.***, proposent une nouvelle classification hiérarchique des actinomycètes qui reposent uniquement sur l'analyse des séquences des ARNr 16S et des gènes codant pour les ARNr 16S. Donc, ils ont décrit une nouvelle classe, qui se définit comme un ensemble de souches présentant plus de 80% de similitude dans la séquence des ARNr 16S ou de l'ADNr 16S et possédant un résidu adénine à la position 906 et un résidu adénine ou cytosine à la position 955 (à l'exception des sous classes *Rubrobacteridae* et *Spherobacteridae* où l'on trouve un résidu uracile à la position 955).

Actuellement et selon la classification du « Taxonomic Outline of The Procaryotes, *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* », seconde édition 2004 (**Garrity *et al.*, 2004**), le **phylum *Actinobacteria*** (bactéries à Gram positif et G+C % élevé) est constitué d'une seule classe dénommée également « ***Actinobacteria*** ». La classe des *Actinobacteria* est divisée en 5 sous-classes (**Figure N°9**) : *Acidimicrobidae*, *Rubrobacteridae* , *Coriobacteridae*, *Sphaerobacteridae*, ***Actinobacteridae***.

Tableau N°7 : Exemples d'enzymes employées dans différents secteurs industriels

(Kirk *et al.*, 2005).

Secteur industriel ou Classe d'utilisation	Enzyme	Application
Industrie des détergents	-Cellulase -Amylase -Protéase -Lipase	-Nettoyage, clarification des couleurs. -Enlèvement des tâches d'amidon -Enlèvement des tâches protéiques -Enlèvement des tâches des graisses
Industrie des boissons	-Pectinase -Amylase	-Dépectinisation, Clarification des jus, broyage. -Traitement des jus.
Produits laitiers	-Pectine méthyl estérase -Protéase -Lipase	-Affermissement de produits à base de fruits. -Lait caillé. -Aromes des fromages.
Industrie textile	-Cellulase -Pectate lyase	-Assouplissement du coton -Lessivage
Pâte à papier	-Cellulase -Xylanase	-Désencrage, améliorant de drainage, Modification de la fibre. -Augmentation du blanchiment

Chacune de ces sous classes est constituée d'un ou de plusieurs ordres eux-mêmes constitués d'une ou de plusieurs familles. Dans la sous-classe des *Actinobacteridae*, l'ordre des *Actinomycetales* est subdivisé en 10 sous-ordres : *Actinomycineae*, *Micrococcineae*, *Corynebacterineae*, *Micromonosporineae*, *Propionibacterineae*, *Pseudonocardineae*, *Streptomycineae*, *Streptosporangineae*, *Frankineae* et *Glycomycineae*.

3- Les actinomycètes : producteurs d'enzymes de biodégradation

Deux des propriétés les plus significatives des actinomycètes sont leur capacité à se développer sur les substrats les plus divers et leur aptitude à synthétiser de très nombreux métabolites bioactifs, parmi lesquels les enzymes, qui après les antibiotiques sont les produits les plus importants des actinomycètes (**Lopes et al., 1999**). L'action des enzymes du catabolisme conduit à la dégradation des nutriments et sources d'énergie plus ou moins complexes.

3-1- Enzymes de biodégradation des composés organiques naturels

Les actinomycètes sont des microorganismes saprophytes, qui jouent un rôle dans la dégradation de la matière organique naturel et donc un rôle dans le recyclage des biopolymères complexes comme la cellulose, la lignocellulose, la pectine et le xylane par la production d'enzymes extracellulaires qui sont d'une importance majeure dans l'industrie (**Tableau N°7**).

La dégradation de ces biopolymères par les enzymes peut être le résultat d'un mécanisme radicalaire (**oxydation biologique**) ou d'un changement chimique (**hydrolyse biologique**).

Dans le cas de l'oxydation biologique, les enzymes réagissent directement avec l'O₂ comme les **cytochromoxidases** qui sont des enzymes actives dans la chaîne respiratoire. La plupart du temps, l'oxygène est incorporé directement au substrat (cas des **oxygénases**). Parfois, il joue le rôle d'un accepteur d'hydrogène (cas des **oxydases**) (**Chandra et Rustgi, 1998**).

Quant à l'hydrolyse biologique, les **protéases** catalysent l'hydrolyse des protéines en acides aminés. Les polysaccharides, par exemple les amidons, sont dégradés enzymatiquement pour libérer des sucres (**Dierckx et Dewettink, 2002 ; Ralet et al., 2002**).

-Les cellulases

Les Actinomycètes, en particulier les espèces thermophiles et les *Streptomyces*, excrètent des enzymes qui dégradent la cellulose (**Sanglier et al., 1993 ; Mason et al., 2001**). Ces enzymes peuvent être classées en trois types : endoglucanases, exoglucanases ou cellobiohydrolases et cellobiases (**Klemm et al., 2002**).

Les endoglucanases sont capables de rompre les liaisons internes de la chaîne cellulosique. L'attaque se fait au hasard et entraîne une libération des sucres réducteurs.

Les exoglucanases attaquent les polymères de cellulose par les extrémités non réductrices et libèrent exclusivement du cellobiose.

Les cellobiases attaquent la liaison β -glucosidique du cellobiose et libèrent deux molécules de glucose (**Onsori et al., 2004**).

D'autres espèces d'actinomycètes produisent des enzymes qui dégradent l'hémicellulose (**Rivas et al., 2003**).

-Les ligninases

Beaucoup d'espèces d'actinomycètes tel que *Streptomyces thermoviolaceus*, *Streptomyces viridosporus*, *Streptomyces fusca* ont une activité lignocellulolytique et sont capable de produire l'hémoperoxydase, enzyme qui dégrade la lignine (**Mason et al., 2001**).

-Les pectinases

La production d'enzymes pectolytiques est élaborée par différents genres d'actinomycètes tel que : *Micromonospora*, *Microbispora*, *Actinoplanes*, *Streptosporangium* et les *Streptomyces* (**Demain et Solomon, 1985 ; Sanglier et al., 1993**). La dégradation complète des pectines est conduite par l'action combinée de trois activités pectolytiques (pectine lyase, pectinestérase, polygalacturonase).

-Les xylanases

Elles sont élaborées par des espèces thermophiles du genre *Streptomyces* et des souches du genre *Promicromonospora*, ainsi que par différentes espèces de *Microbispora*,

Micromonospora et *thermomonospora* (**Demain et Solomon, 1985 ; Rivas et al., 2003 ; Petrosyan et al., 2003**).

-Les amylases

Elles sont produites par la majorité des actinomycètes, les plus intéressantes sont celles produites par les espèces thermophiles comme *Thermoactinomyces vulgaris*, *Thermomonospora curvata*, *Saccharomonospora viridis* et les espèces du genre *Streptomyces* (**Demain et Solomon, 1985 ; Sanglier et al., 1993**).

-Les dextrinases

Elles sont excrétées par de nombreuses souches d'*Oerskovia xanthineolytica* et *Actinomyces israeli* (**Demain et Solomon, 1985**).

-Les chitinases

Elles sont produites par de nombreux genres d'actinomycètes tel que les genres *Microbispora*, *Micromonospora*, *Nocardiopsis*, *Planobispora*, *Planomonospora*, *Thermoactinomyces*, *Thermomonospora* et par les espèces *Nocardia mediterranei*, *Actinomadura pelletierii* (**Hsu et Lockwood, 1975 ; Demain et Solomon, 1985**).

-Les lipases

Les lipases endo et exocellulaires sont isolées à partir de l'espèce *Thermoactinomyces vulgaris*. Des phospholipases sont également isolées avec un taux élevé à partir des espèces du genre *Streptoverticillium* et de l'espèce *Micromonospora chalcea* (**Demain et Solomon, 1985**).

-Les protéases

Des protéases alcalines thermostables sont produites par les espèces thermophiles du genre *Micropolyspora*, d'autres protéases résistantes à la majorité des inhibiteurs de protéases, sont isolées à partir du genre *Oerskovia*, d'autres genres d'actinomycètes tel que les genres *Actinomadura*, *Micromonospora*, *Nocardiopsis*, *Planomonospora*, *Planobispora* sont capables de produire des kératinases. Les élastinases sont élaborées par plusieurs souches appartenant à 14 genres d'actinomycètes (**Demain et Solomon, 1985 ; Chitte et al., 1999**).

3-2- Enzymes de biodégradation des composés organiques de synthèse

Les capacités biodégradatrices des actinomycètes ne se limitent pas seulement aux composés organiques naturels mais concernent également des substrats organiques plus difficiles à dégrader car peu solubles dans l'eau. Il s'agit des hydrocarbures (chaînes hydrocarbonées), de phénols et d'autres composés récalcitrants (**Kimura et Urushigawa, 2001 ; Lin *et al.*, 2005**).

Le principal mécanisme enzymatique pour l'assimilation et/ou la détoxification de substrats organiques peu dégradables est l'oxydation enzymatique par les **monoxygénases** ou **dioxygénases**: il y a formation de groupes polaires qui permettent d'augmenter la solubilité de nombreux substrats organiques peu soluble dans l'eau (hydrocarbures ou hydrocarbures aromatiques polycycliques) et de faciliter ainsi leur assimilation (**Cerniglia, 1992 ; Pelmont, 1993 ; Bossert et Kosson, 1997**). C'est également, le mécanisme de biodégradation des composés nitroaromatiques (**Nishino and Spain, 1997**) et des substrats organochlorés tels que les chlorobiphényles (**PCB**) (**Focht, 1997**).

Pour ces derniers, la déchloration bactérienne a été démontrée en condition anaérobie avec formation de métabolites facilement biodégradables en aérobiose.

Tableau N°8 : Exemples de composés organiques synthétiques métabolisés par les actinomycètes.

Composé	Microorganisme	Bibliographie	Type de dégradation
Hydrocarbures monoaromatiques : Benzène, toluène, xylène, phénols, crésols.	<i>G.alkanivorans</i> CC-JG39 <i>Mycobacterium</i> sp. T103, T104 <i>R. opacus</i> M213 <i>R.phenolicus</i> G2P <i>Rhodococcus</i> sp. DK17 <i>Rhodococcus</i> sp. MS11	Lin <i>et al.</i> , 2005 Uz <i>et al.</i> , 2000 Kimura and Urushigawa, 2001 Rehfuss and Urban, 2005 Kim <i>et al.</i> , 2002 Rapp and Gabriel-jugens, 2003	SCE* SCE SCE SCE SCE SCE
Hydrocarbures polyaromatiques (PAH)	<i>Gordonia</i> -like Strain BP9	Mutnuri <i>et al.</i> , 2005	SCE
Acide phtalique	<i>Rhodococcus</i> sp. RHA1 <i>Rhodococcus</i> sp. YU6 <i>M.vanbaalenii</i> PYR-1	Navarro-Liorens <i>et al.</i> , 2005 ; Patrochan <i>et al.</i> , 2005 Jang <i>et al.</i> , 2005 Stingley <i>et al.</i> , 2004	SCE SCE SCE
Esters d'acide phtalique	<i>R.rhodochrous</i> ATCC 21766	Nalli <i>et al.</i> , 2002	Cométabolisme avec l'hexadécane
Monochlorobenzène Dichlorobenzène Mono- et dichlorophenols Tri- et tetrachlorophenol Tri- et tetrachlorobenzènes Pentachlorophénol	<i>R.phenolicus</i> G2P <i>Rhodococcus</i> sp. MS11 <i>R. opacus</i> 1CP <i>R.percolatus</i> MBS1 <i>Rhodococcus</i> sp. MS11 <i>M.chlorophenolicum</i> CP-2	Rehfuss and Urban, 2005 Rapp and Gabriel-jugens, 2003 Gurther <i>et al.</i> , 2004 Brigilia <i>et al.</i> , 1996 Rapp and Gabriel-jugens, 2003 Hagblom <i>et al.</i> , 1988	SCE SCE SCE SCE SCE Minéralisation en présence de 0.1% de glucose
Gomme isoprène	<i>G.westfalica</i> Kb2 <i>G.polyisoprenivorans</i> Kd2	Linos <i>et al.</i> , 2002 Linos <i>et al.</i> , 2002	SCE SCE

(*) SCE : source de carbone et d'énergie.

Il existe actuellement un certain nombre de travaux qui s'intéressent à la prédiction informatisée de la biodégradabilité à partir des réactions connues de biodégradation (**Bollag, 1974 ; Niemi and Veith, 1989 ; SEFA, 1990**).

3-3- Pouvoir dégradant des corynébactéries

Parmi les actinomycètes le sous-ordre *Corynebacterineae* héberge la majorité de microorganismes dégradants les xénobiotiques.

Les espèces des genres *Gordonia*, *Rhodococcus* et *Mycobacterium* sont les mieux connues pour leur versatilité métabolique et leur capacité de dégrader les xénobiotiques rencontrées au hasard dans l'environnement (**Bell et al., 1998 ; Arenskotter et al., 2004 ; Larkin et al., 2005**).

Des exemples de différents types de composés organiques qui peuvent être dégradés par ces trois genres d'actinomycètes sont présentés dans le **tableau N°8**.

-Pouvoir dégradant du genre *Gordonia*

Dans les dernières années plusieurs rapports sont publiés sur les souches *Gordonia* ayant un pouvoir dégradant des composés xénobiotiques. Plusieurs isolats de ce genre utilisent le benzène, le toluène, le xylène, le pyrène et le diester de phthalate comme seule source de carbone et d'énergie.

Deux espèces du genre *Gordonia* sont capables de métaboliser plusieurs diesters de phthalate : la souche *Gordonia* sp.MTCC 4818, croit sur le dibutyle-, le butyle benzyle- et le diphényle phthalates et la souche *Gordonia* sp.P8219 qui croit sur le diéthyle-, le dinonyle-, le dihexyle- et le di-2-éthyle hexyle phthalate (**Chatterjee et Dutta, 2003 ; Nishioka et al., 2006**).

Les voies de dégradations du butyle benzyle phthalates par la souche MTCC 4818 sont bien étudiées. La première réaction est l'hydroxylation qui donne les monoesters de phthalate, l'acide phthalique, l'alcool de benzyle et le butanol ; l'acide phthalique est le produit final de la réaction.

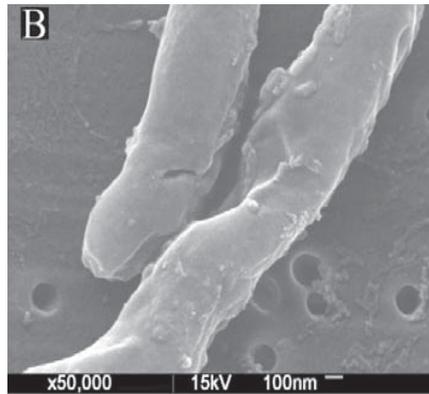


Figure N°10 : SEM micrographe de la croissance de *R. opacus* sur milieu minéral contenant le toluène comme seule source de carbone, (Tsitko, 2007).

SEM : Scanning electron microscopy

La souche utilise l'alcool benzyle et le 1-butanol pour sa croissance. L'alcool benzyle est minéralisé en catéchol, suivie par l'ortho-clivage du cycle aromatique (**Chatterjee et al., 2005**).

L'activité estérase entraînant l'hydrolyse des liaisons esters du butyl benzyl phthalate est induite en présence de butyle benzyle phthalate et du monobenzyle phthalate ce qui indique la spécificité de l'enzyme à cet xénobiotique.

Parmi les propriétés les plus intéressantes du genre *Gordonia* est la capacité de dégrader les gommes isoprène naturelles et synthétiques. Deux nouvelles espèces sont décrites par leur pouvoir dégradant des gommes : *G.polyisoprenivorans* (**Linos et al., 1999**) et *G.westfalica* (**Linos et al., 2002**).

Le mécanisme de biodégradation entraîne une réduction des longues chaînes de polymères via une oxydation en cis-1,4 doubles liaisons. Ce type de dégradation des gommes est observé uniquement chez les organismes contenant des acides mycoliques (**Rose et Steinbuchel, 2005**).

-Pouvoir dégradant du genre *Rhodococcus*

Plusieurs espèces du genre *Rhodococcus* sont isolées des sols pollués (**Figure N° 10**). Ceci est dû à leur versatilité métabolique, les voies métaboliques de plusieurs isolats sont étudiées en détails. Les mono- et dioxygénases sont caractérisés biochimiquement et génétiquement chez beaucoup d'espèces de ce genre (**Gurtler et al., 2004**).

Les hydrocarbures aromatiques et aliphatiques halogénés sont des produits toxiques et résistants à la dégradation biologique. Bien que beaucoup de microorganismes sont capables de dégrader le benzène monochloré, seulement quelques espèces du genre *Rhodococcus* peuvent utiliser ce substrat (**Zaitsev et al., 1993 ; Rehfuss and Urban, 2005**).

La dégradation des esters de phthalates par *Rhodococcus* est devenue très documentée (**Aleshchenkova et al., 1996 ; Nalli et al., 2002 ; Li et al., 2006**). Quelques organismes sont isolés à partir des sols lourdement contaminés par les phthalates et les tétraphthalates (**Aleshchenkova et al., 1996**).

De nombreuses espèces isolées du genre *Rhodococcus* dégradent un large spectre de composés récalcitrant. Par exemple, *R.opacus* SAO101 est capable de croître sur le phénol, le

benzène, le 4-nitrophénol, le biphényle, le naphthalène, le dibenzofurane et le dibenzo-p-dioxine (Kimura et Urushigawa, 2001). *R. opacus* M213 dégrade le naphthalène, le toluène, le phénol et l'hydroxybenzoate (Uz *et al.*, 2000).

La dégradation versatile du genre *Rhodococcus* est due à la présence de larges plasmides linéaires portants des gènes codant pour la dégradation de différents composés (Van der Geize et Dijkhuizen, 2004 ; König *et al.*, 2004).

Un exemple de ces organismes est *Rhodococcus* sp.RHA1, qui utilise de multiples systèmes enzymatiques pour dégrader le biphényle (Kitagawa *et al.*, 2001) et contenant des gènes codant pour la dégradation des phtalates (Patrauchan *et al.*, 2005).

-Pouvoir dégradant du genre *Mycobacterium*

Un nombre limité de genres bactériens est capable de dégrader les hydrocarbures aromatiques polycycliques (*Polycyclic aromatic hydrocarbons* ou PAHs) : *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Mycobacterium*, *Rhodococcus* et *Sphingomonas* (Kanaly et Harayama, 2000 ; Mrozik *et al.*, 2003).

En effet la majorité des isolats capable de croître sur les PAHs (fluoranthène, pyrène,...), appartiennent au genre *Mycobacterium* (Mrozik *et al.*, 2003).

Les Mycobactéries sont présentes en nombre élevé dans les sols contaminés par une faible concentration de PAHs par rapport aux sols contaminé par une concentration élevée de ceux-ci.

Plusieurs espèces du genre *Mycobacterium* sont aussi capable de dégrader les tri-, tétra- et penta-chlorophénols (Apajalahti et Salkinoja-Salonen, 1987 ; Haggblom *et al.*, 1988). D'autres études ont montré le rôle important de ce genre dans la dégradation du toluène (Tay *et al.*, 2001).

Matériels et méthodes

1- Isolement de souches d'actinomycètes

1-1-Prélèvement des échantillons

Des échantillons de deux sols agricoles (Sissaoui et Ain-El-Karma) et deux sols forestiers (Djebel-El-Ouahch et Chaab-Rssas) ont été prélevés par la technique de **Pochon et Tradieux (1962)**.

Après avoir écarté les cinq premiers centimètres de sol, une quantité suffisante de terre est prélevée du sol, jusqu'à 10 centimètres de profondeur, Puis déposée à l'aide d'une spatule sur une feuille d'aluminium stérile.

Après un premier tri, écartant les pierres et les débris végétaux, l'échantillon est récupéré dans un flacon stérile. Les échantillons sont transportés au laboratoire et sont immédiatement analysés.

1-2-Mesure du pH des échantillons

Cette mesure est réalisée dès l'arrivée des prélèvement au laboratoire. La technique consiste à déterminer la valeur du pH d'une suspension de sol en eau distillée (5g de sol pour 12,5 ml d'eau distillée) (**Pochon et Tradieux, 1962**).

1-3- Milieux d'isolement

Deux milieux sélectifs pour actinomycètes sont utilisés (**Annexe1**) :

-Milieu Olson (**Olson, 1968**), additionné d'actidione (antifongique) à une concentration de 40 ug/ml.

-Milieu Amidon Caséine (**Ravel et al., 1998**), additionné de nystatine (antifongique) à une concentration de 50 ug/ml et d'acide nalidixique (antibactérien) à 10 ug/ml.

Les solutions d'antibiotiques sont préparés puis stérilisés par filtration sur membrane type millipore (de 0,22 um de porosité) et sont ajoutées stérilement aux différents milieux refroidis à 45°C.

1-4- Méthode d'isolement

Pour chaque échantillon, 1g de sol est dilué dans 9ml d'eau physiologique stérile, puis agité au vortex deux fois pendant 5 minutes, cette suspension constitue la dilution 10^{-1} .

Une série de dilutions décimales (jusqu'à 10^{-5}) est effectuée pour chaque échantillon. Les deux milieux sont ensemencés en masse à raison de 0,1ml par dilution par boîte de Pétri. Les boîtes sont incubées à 28°C et observées quotidiennement pendant une durée de 4 semaines.

1-5- Prélèvements des colonies d'actinomycètes

Dans un premier temps, les colonies d'actinomycètes sont repérées d'après leur aspect **macroscopique** caractéristique (colonies dures incrustées dans la gélose). Puis par leur aspect **microscopique** (colonies circulaires constituées d'hyphes), par observation directe sous microscope optique (Leica DMLS) grossissement $\times 10$.

Pour une observation plus claire, une colonie entière est placée sur une lame stérile et après élimination du maximum d'Agar, elle est légèrement écrasée avec une lamelle et observée sous microscope optique (grossissement $\times 40$), (**Suzuki, 2001**).

1-6- Coloration de Gram

Elle est effectuée selon la méthode classique. Des frottis de colonies répondant aux caractéristiques macroscopiques et microscopiques des actinomycètes sont préparés, colorés puis observés sous microscope optique (grossissement $\times 100$). Les colonies Gram positif sont toutes repiquées sur le milieu Olson.

2- Conservation de souches d'actinomycètes isolées et purifiées

Les souches purifiées appartenant aux actinomycètes sont conservées selon deux méthodes :

2-1- Gélose inclinée

les souches sont ensemencées sur milieu Olson en gélose inclinée, après incubation à 28°C pendant 21 jours, les cultures sont conservées à 4°C, un repiquage est réalisé tous les deux mois.

2-2- Congélation des cultures sporulées

les souches sont ensemencées sur milieu gélosé, puis incubées jusqu'à sporulation, une suspension de spores est préparée par raclage de la surface de la culture puis conservée par congélation à – 20°C en présence du glycérol (cryoprotecteur) à 20% (**Isik *et al.*, 1999**).

3- Préparation des inoculums pour les tests de biodégradation et de préidentification

Des tubes contenant le milieu ISP3 gélosé inclinée (**Annexe1**) sont ensemencés par les souches d'actinomycètes isolées et purifiées puis incubées pendant 21 jours à 28° C. La surface des colonies est raclée et une suspension dense de fragments mycéliens et de spores est préparée en eau physiologique stérile, celle-ci constitue l'inoculum (**Shirling et Gottlieb, 1966 ; Suutari *et al.*, 2002**).

Pour chaque souche, l'inoculum est préparé de telle manière à obtenir une densité optique égale à 0,1 pour une longueur d'onde de 660 nm.

4- Mise en évidence de la biodégradation des composés organiques complexes naturels

Deux composés ont été étudiés : la cellulose et la pectine.

4-1- Biodégradation de la cellulose (activité cellulolytique)

- **1^{ère} Méthode**

Cette étude est réalisée sur le milieu de base ISP9 (*International Streptomyces Project*) (**Annexe1**) contenant la cellulose cristalline (Sigmacell, type 101) à une concentration de 1% (p/v) comme seule source de carbone et d'énergie.

Pour chaque souche, deux boîtes sontensemencées en surface. La lecture est effectuée après 21 jours d'incubation à 30°C.

L'utilisation de la cellulose est appréciée en comparant les cultures avec la croissance obtenue sur le milieu ISP9 sans source de carbone servant de contrôle négatif et avec le milieu ISP9 additionné de glucose servant de contrôle positif (**Pridham et Gottlieb, 1948 ; Wink et al., 2003; Lekchiri et al., 2006**).

- **2^{ème} Méthode**

Pour chaque souche, 2 tubes à essai contenant chacun 9 ml du milieu liquide ISP9 (**Annexe1**) et une bandelette 0,5 x 10 cm de papier filtre whatman N°1 stérile, comme unique source de carbone et d'énergie (**Boulahrouf et al., 1986**), sontensemencés par 1 ml d'inoculum préalablement préparé, un tube nonensemencé sert de témoin.

Les cultures sont incubées à 30°C pendant 21 jours. L'activité cellulolytique est mise en évidence par la digestion du papier filtre Whatman N°1.

4-2- Biodégradation de la pectine (activité pectinolytique)

- **1^{ère} Méthode**

Elle est réalisée sur le milieu de base ISP9 (**Annexe1**) contenant la pectine de pomme (Fluka AG, CH-9470 Buchs, Asche ~ 2-4%) à une concentration de 1% (p/v) comme seule source de carbone et d'énergie.

Pour chaque souche, deux boîtes sont ensemencées en surface. La lecture est effectuée après 21 jours d'incubation à 30°C.

L'utilisation de la pectine est appréciée en comparant les cultures avec la croissance obtenue sur le milieu ISP9 sans source de carbone servant de contrôle négatif et avec le milieu ISP9 additionné de glucose servant de contrôle positif (**Pridham et Gottlieb, 1948 ; Bruhlmann et al., 1994 ; Wink et al., 2003**).

- **2^{ème} Méthode**

Les souches sont ensemencées sur le milieu pectine Agar (**Annexe1**). Après incubation à 30°C pendant 5 jours, les boîtes sont recouvertes par une solution de CTAB (bromure d'héxadecyl triméthyl ammonium) à 1% (p/v) et laisser a température ambiante pendant quelques minutes, puis laver à l'eau distillée stérile.

L'activité pectinolytique est mise en évidence par l'apparition de zones claires autour des colonies (**Hankin et al., 1971 ; Nicemol et al., 2006**).

5- Mise en évidence de la biodégradation des composés organiques de synthèse

Deux polluants organiques ont été étudiés, le 2,5-xylénol et le 2,6-xylénol.

5-1-Biodégradation de 2,5-xylénol et du 2,6-xylénol

Les souches d'actinomycètes isolées et purifiées sont ensemencées en surface sur un milieu minimum contenant le 2,5-xylénol ou le 2,6-xylénol comme unique source de carbone et d'énergie à une concentration de 0,2g/l (**Alexander et Lustigman, 1966**) (**Annexe1**). Pour chaque souche, deux boîtes sont ensemencées et incubées à 28°C pendant 21 jours.

La biodégradation est appréciée en comparant les cultures avec la croissance obtenue sur le milieu minéral sans source de carbone servant de témoin négatif et avec le milieu minéral additionné de glucose servant de contrôle positif.

5-2-Tolérance au 2,5-xylénol et au 2,6-xylénol

Comme pour la technique de diffusion en gélose ou méthode des disques servant à déterminer l'activité d'un antibiotique sur des bactéries, le degré de tolérance des souches dégradant les deux types de xylénols est vérifiée de la même façon.

Pour ce faire, les inoculas des souches dégradant les deux types de xylénols sont ensemencés par inondation sur le milieu Amidon Caséine. Après séchage pendant 30 minutes, des disques de papier filtre Whatman N°1 de 4 mm de diamètre chargés de différentes concentrations (500, 1000, 2000, 3000 mg/l) de 2,5-xylénol et de 2,6-xylénol (à raison de 20 µl par disque) sont déposés sur la surface de la gélose. Un disque sans xylénols sert de témoin négatif. Pour chaque substrat et chaque souche deux boîtes sont préparées (**Lebrecque, 2003**).

Les disques diffusent alors les xylénols qui inhibent ou non la croissance des souches autour des disques. La croissance des souches sur géloses est suivie pendant 7 jours à 30°C.

6- Préidentification des souches actives

6-1-Aspect macroscopique

L'aspect macroscopique des différentes souches actives est déterminé sur les milieux de l'*International Streptomyces Project* : ISP2, ISP3, ISP4 et ISP5 recommandés par **Shirling et Gottlieb (1966) (Annexe1)**.

Les milieux sont stérilisés et répartis en boîtes de Pétri 24 heures avant leur utilisation, afin de contrôler leur stérilité, ils sont ensuite ensemencés en stries à partir d'une à deux gouttes de l'inoculum.

L'aspect macroscopique (couleur, forme, etc.) des colonies est observé après 21 jours d'incubation à 30°C (**Shirling et Gottlieb, 1966 ; Mocheva et al., 2002 ; Oskay et al., 2004**).

La couleur du mycélium du substrat n'est pas toujours claire, pour la déterminer, une parcelle de la gélose est découpée à partir des cultures matures, puis déposée sur un support désinfecté. L'excès de la gélose est éliminé par une lame de rasoir et la couleur est notée (**Shirling et Gottlieb, 1966**).

6-2-Détermination des pigments mélanoides et des pigments diffusibles

La mise en évidence des pigments mélanoides produits par les souches actives est réalisée sur les milieux ISP6 et ISP7 (**Annexe1**) en gélose inclinée. Un tube non ensemencé sert de témoin. L'observation de la couleur brune noir caractéristique des pigments mélanoides se fait au 2^{ème} et au 4^{ème} jusqu'au 7^{ème} jour, en comparant les tubes ensemencés avec le témoin (**Shirling et Gottlieb, 1966 ; Mocheva et al., 2002**).

S'il y a production de pigments diffusibles de couleurs différentes, autre que la couleur brun-noir caractéristique des pigments mélanoides, la couleur est notée (**Shirling et Gottlieb, 1966**).

6-3- Aspect microscopique

L'observation de la morphologie des chaînes de spores, du mycélium aérien et du mycélium du substrat est effectuée selon deux techniques :

6-3-1-Technique de culture sur lame

Les souches actives sont ensemencées, à raison d'une goutte de l'inoculum sur une portion rectangulaire d'Agar de 1cm x 1cm x 2mm d'un milieu solide ISP2, ISP3, ISP4 ou ISP5. Ce rectangle est déposé sur une lame puis recouvert avec une lamelle.

La culture sous forme de sandwich est incubée à 30°C pendant 21 jours. L'observation se fait au microscope optique (G x 100) (**Zaitlin et al., 2003**).

6-3-2-Technique de culture sur lamelle

Cette technique consiste à insérer délicatement une lamelle stérile dans un milieu gélosé ISP2, ISP3, ISP4 ou ISP5, de telle sorte qu'elle forme un angle de 45°C avec la surface de celui-ci. Une goutte de l'inoculum est déposée contre la lamelle en contact avec le milieu.

Après 14 jours d'incubation à 30°C, la lamelle est retirée soigneusement de la gélose, entraînant avec elle des fragments du mycélium du substrat et aérien, elle est ensuite déposée sur une lame puis examinée au microscope optique (G x 100).

6-4- Détermination de l'acido-alcool-résistance

Les frottis des souches d'actinomycètes actives sont préparés à partir des cultures de 5 jours d'incubation sur le milieu GSEA (Glycerol Extrait de Sol) (**Annexe1**), puis fixés par du méthanol à froid (**Gordon et Smith, 1954**).

6-4-1-Coloration de Ziehl-Neelsen

La coloration de Ziehl-Neelsen est une méthode permettant l'identification des Mycobactéries, elle fait partie des colorations qui mettent en évidence l'acido-alcool-résistance de ce genre d'actinomycètes.

Ce type de coloration comprend deux temps :

1^{er} temps : coloration des frottis par la fuschine de Ziehl à chaud (**Annexe2**)

- Recouvrir les frottis d'un papier filtre imprégné de fuchsine de Ziehl.
- Chauffage à émission de vapeur pendant dix minutes au moins sans ébullition
- Rinçage à l'eau distillée stérile.

2^{ème} temps : décoloration par le décolorant de Ziehl-Neelsen (**Annexe2**) pendant 3 minutes, puis rinçage et séchage.

L'observation s'effectue au microscope optique, avec l'objectif à immersion (G x 100).

Les cellules des Mycobactéries qui sont acido-alcool-résistantes apparaissent en rouge, alors que celles des autres actinomycètes prennent la coloration bleue (**Larpent et Larpent-Gourgaud, 1985b ; Hamid et al., 2001**).

6-4-2-Coloration de Ziehl-Neelsen modifiée

Cette méthode de coloration permet la mise en évidence de l'acido-alcool-résistance partielle des *Nocardia* et genres apparentés.

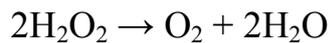
Elle est réalisée selon le protocole de **Gordon et Smith (1954)**. Les frottis sont recouverts par une solution de carbolfuschine (**Annexe2**), puis chauffés pendant 3 minutes, les lames sont

ensuite rincées à l'eau distillée stérile, décoloré par l'acide-alcool (**Annexe2**), lavées à l'eau et enfin contre colorées avec le bleu de méthylène pendant 2 minutes. Les actinomycètes acido-alcool-résistantes partiels apparaissent en rose.

6-5- Caractéristiques biochimiques

6-5-1-Recherche de la catalase

La catalase est une enzyme catalysant la dismutation de l'eau oxygénée (peroxyde d'hydrogène), selon la réaction suivante :



Elle est mise en évidence par contact de la culture avec une solution fraîche d'eau oxygénée. Pour chaque souche une goutte d'eau oxygénée est placée sur une lame stérile sur laquelle quelques colonies sont réparties. Un dégagement gazeux abondant sous forme de mousse ou de bulles d'air traduit la décomposition de l'eau oxygénée sous l'action de la catalase.

6-5-2-Recherche de la Bêta –Galactosidase

La bêta- Galactosidase est une enzyme qui permet l'hydrolyse du lactose en glucose et galactose. Elle est recherchée par l'utilisation des disques ONPG (Orthonitophényl-Bêta-Galactoside), substrat synthétique incolore dont la structure est proche de celle du lactose, et qui en présence de bêta- Galactosidase donne l'ONP (Orthonitophénol) de couleur jaune.

La technique est réalisée selon le protocole de **Flores *et al.* (1990)**. Les souches d'actinomycètes acido-alcool résistantes sont d'abord cultivées sur gélose à la cervelle et au cœur de veau (**Annexe1**) pendant 5 jours. A partir de ces cultures, une suspension épaisse est préparée dans 0,5 ml d'eau distillée stérile dans laquelle un disque ONPG est introduit. Après incubation de 18 heures à 30°C, l'apparition de la couleur jaune est notée.

6-5-3-Recherche de la Nitrate-Réductase

La Nitrate-Réductase est une enzyme qui catalyse la réduction des nitrates NO^{-3} en NO^{-2} (nitrite) ou en N_2 . Elle est mise en évidence selon le protocole de **Gordon et Smith (1953)**.

10 ml de bouillon nutritif (**Annexe1**) contenant 0,1% de nitrate de potassium sont ensemencés par les souches d'actinomycètes puis incubés à 30°C. Aux 5^{ème}, 10^{ème} et 14^{ème} jours d'incubation, 3 gouttes de chacun des réactifs de Greiss I (acide sulfanilique) et Greiss II (α -naphtylamine) sont ajoutées.

La réduction des nitrates en nitrites est mise en évidence par l'apparition d'une couleur rouge orangée, en cas d'absence de cette coloration, quelques milligrammes de poudre de zinc sont alors ajoutés, s'il y a :

-apparition de coloration rouge : présence de nitrate dans le milieu et les souches ne possèdent pas l'enzyme.

-apparition de couleur jaune : pas de nitrate dans le milieu et les souches possèdent l'enzyme qui réduit les nitrates jusqu'au stade N₂.

6-6- Caractères physiologiques

6-6-1-Détermination de la température optimale de croissance

Les souches actives sont ensemencées en surface sur le milieu de culture sporulation Agar (**Annexe1**), à raison de 2 boîtes de Pétri par souche pour chaque température d'incubation. La croissance est estimée visuellement à 28°C, 30°C, 37°C, 45°C, 55°C après incubation pendant 21 jours (**chun et al., 1998**).

6-6-2-Détermination du pH optimum de croissance

Les souches actives sont ensemencées sur le milieu CYD (**Annexe1**), tamponné à différents pH (5,5, 6,0, 6,5, 7, 7,5, 8). Le pH final est ajusté juste avant stérilisation.

La croissance des souches est estimée visuellement après 21 jours d'incubation à 30°C (**Crawford et al., 1993**).

6-6-3-Détermination du type respiratoire

Elle est réalisée selon le protocole de **Guiraud (1998)**. La gélose profonde viande foie (VF) répartie en tube (**Annexe1**) régénérée par chauffage au bain marie bouillon pendant 30 minutes, puis refroidie jusqu'à 45°C estensemencée à l'aide d'une pipette pasteur qui est plongée au fond du tube, puis remontée en décrivant une spire, de façon àensemencer uniformément le milieu. Après refroidissement et solidification du milieu, les cultures sont incubées à 35°C pendant 21 jours.

6-6-4-Détermination de la mobilité

Elle est réalisée sur le milieu semi solide de mannitol-mobilité (**Guiraud, 1998**) (**Annexe1**), l'ensemencement est réalisé par piqûre centrale. Après incubation pendant 7 jours à 30°C, la mobilité se traduit par l'envahissement du milieu à partir de la piqûre d'inoculation.

6-6-5-Détermination de la résistance au lysozyme

Le lysozyme est une hydrolase acide qui détruit la paroi bactérienne en particulier celle à Gram positif en catalysant l'hydrolyse des glycosaminoglycanes.

Parmi les actinomycètes résistants au lysozyme, il y a le genre *Nocardia et Tsukamurella*.

Pour déterminer la résistance ou non au lysozyme, les souches d'actinomycètes acido-alcool résistants sont d'abord cultivées 24 à 48 heures dans le milieu Bennett (**Annexe1**) liquide, puisensemencées par inondation sur des boîtes de Mueller-Hinton (**Annexe1**).

Après séchage pendant 30 minutes, des disques de papier filtre Whatman N°1 de 4 mm de diamètre imprégnés par une solution de lysozyme à une concentration de 2,5mg/ml (à raison de 20µl par disque) sont déposés sur les boîtes. L'incubation se fait à 30°C pendant 24 heures. L'absence de zone d'inhibition indique la résistance (**Carlotti et al., 1994, Boiron et al., 1993**).

Résultats et discussion

Tableau N°9 : Description des échantillons.

Echantillon	Site de prélèvement	Description	pH
01	Sol agricole Ain-El-karma	Couleur marron foncé, terre homogène humide de type prairie, présence de petits arbustes.	7,58
02	Sol forestier Chaab-Rssas	Couleur marron orangé, terre sablée sèche, présence de petits arbustes et cailloux.	7,96
03	Sol forestier Djebel-El-Ouahch	Couleur marron clair, terre humide, riche en humus.	8,23
04	Sol agricole Sissaoui	Couleur marron foncé, terre homogène humide de type prairie, présence de petits arbustes.	8,15

Tableau N°10 : Nombre de colonies d'actinomycètes prélevées.

Echantillon	Nombres de colonies prélevées	
	Olson	Amidon-Caseine
Sol Ain-El-karma	14	9
Sol Chaab-Rssas	3	0
Sol Djebel-El-Ouahch	4	3
Sol Sissaoui	4	2
Total	25	14

1-Isolement des souches d'actinomycètes

1-1- Résultats

1-1-1- Caractéristiques des échantillons

Les caractéristiques et pH des échantillons prélevés sont résumés dans le **tableau N°9**. On constate que l'ensemble des échantillons examinés (deux sols agricoles et deux sols forestiers) représente des écosystèmes riches en débris végétaux et matières organiques, ils se caractérisent par des pH neutres ou légèrement alcalin allant de 7,58 à 8,23.

1-1-2- Prélèvement des colonies d'actinomycètes

L'isolement de souches d'actinomycètes réalisé à partir de quatre échantillons différents, sur deux milieux sélectifs (Olson et Amidon-Caséine) additionnés d'antibiotiques a conduit aux résultats présentés dans le **tableau N°10**.

À partir des deux milieux sélectifs utilisés, **39** colonies d'actinomycètes ont été prélevées, elles sont repérées d'après leur aspect macroscopique (colonies dures incrustées dans la gélose) et leur aspect microscopique (aspect filamenteux à coloration de Gram positive).

Selon les résultats rassemblés dans le **tableau N°10**, on constate que pour les deux milieux utilisés, nous observons une différence importante de la taille de la flore actinomycétale isolée entre les différents échantillons de sols malgré qu'ils sont tous riches en matières organiques et de pH proche de la neutralité. Ainsi, le nombre de colonies isolées est de **23** pour l'échantillon 1, **3** pour l'échantillon 2, **7** pour l'échantillon 3 et **6** pour l'échantillon 4. Il apparaît que le plus grand nombre d'actinomycètes est obtenu à partir de l'échantillon 1, soit **23** colonies d'actinomycètes et **16** colonies seulement pour les autres échantillons.

D'autre part, le plus grand nombre de colonies d'actinomycètes prélevées est obtenu avec le milieu Olson, soit **25** colonies d'actinomycètes contre **14** colonies pour le milieu Amidon-Caséine.

1-2-Discussion

L'isolement sélectif des actinomycètes à partir de leur habitat, pose problème. En effet trop de substrats favorisent les champignons et les bactéries à croissance rapide et empêchent

de ce fait un isolement facile des actinomycètes qui ont un temps de génération relativement long (**Williams et al., 1982 ; Crawford et al., 1993**). La présence dans le milieu d'isolement, de la chitine, de l'amidon, du glycérol, de l'arginine, de l'asparagine, de la caséine et des nitrates conduit à un isolement sélectif des actinomycètes alors que les bactéries et les champignons poussent faiblement (**Williams et Davies, 1965**).

Pour cela, le milieu Amidon-Caséine a été utilisée dans cette étude, il contient des substrats sélectifs pour la croissance des actinomycètes (l'amidon et la caséine) et il est utilisé dans de nombreux travaux d'isolement d'actinomycètes à partir des écosystèmes variés. **Williams et Davies (1965)** ont utilisé ce milieu pour un isolement sélectif des actinomycètes de sol. De même **Hagedorn (1976)** a pu isoler une variété de *Streptomyces* à partir de sols arides. **Suzuki (2001)** a utilisé ce milieu pour l'isolement des actinomycètes appartenant aux genres rares comme *Actinomonospora*, *Actinopolyspara*, *Planomonospora* et *Planobispora*. Ce milieu a été également utilisé par **Benimeli et al. (2003)** pour l'isolement des actinomycètes à partir des eaux usées contaminées par les pesticides organochlorés.

Le deuxième milieu sélectif utilisé pour l'isolement des actinomycètes est le milieu olson, ce milieu le plus spécifique et le plus sensible aux actinomycètes contenant le sodium caséinate et l'asparagine favorisant la croissance des actinomycètes. Ce milieu a été utilisé par **Hilalli et al. (2002)**, qui ont trouvé que c'est le milieu le plus favorable pour la sélection des actinomycètes à partir du sol.

Plusieurs techniques ont été utilisées pour l'isolement sélectif des actinomycètes, elles reposent essentiellement sur le traitement à la chaleur des échantillons et l'addition aux milieux d'isolement des substances inhibitrices, stoppant la croissance des germes envahisseurs (**Larpent et Sanglier, 1989; Ouhdouche et al., 2001; Hilali et al., 2002; Jung yeop lee, 2002**).

C'est cette dernière méthode que nous avons adoptée au cours de notre travail. Les avis concernant l'utilisation des antibiotiques sont cependant controversés. Selon **Porter et al. (1960)** la plupart des antibactériens utilisés inhibent beaucoup d'actinomycètes. En revanche, **Dulaney et al. (1955), Williams et Davies (1965)**, recommandent l'utilisation d'un mélange d'antifongiques et d'antibactériens pour l'isolement des actinomycètes.

L'actidione (cyclohexémide) à 50-100ug/ml, la piramicine et la nystatine à une concentration respectivement de 10 et 50ug/ml sont les antifongiques les plus utilisés comme

additifs dans les milieux d'isolements des actinomycètes (**Dulaney et al., 1955 ; Porter et al., 1960**). Les antibactériens les plus utilisés dans l'isolement sélectif des actinomycètes, sont la polymyxine à 5ug/ml, la pénicilline à 1ug/ml et l'acide nalidixique à 10ug/ml (**Williams et Davies, 1965 ; Cavala, 1994 ; Takizawa et al., 1993**).

Dans ce but le milieu Amidon-Caséine est additionné de nystatine à une concentration de 50ug/ml et d'acide nalidixique à une concentration de 10ug/ml. La nystatine ajoutée au milieu a inhibé la croissance des champignons. **Williams et Davies (1965)** ont testé cet antifongique sur des champignons isolés du sol, ils ont constaté qu'il a inhibé leur croissance en majorité à une concentration de 50ug/ml, en plus cet antibiotique lorsqu'il est testé sur les actinomycètes n'a pas altéré leur croissance même en augmentant sa concentration à 100ug/ml.

L'addition de l'acide nalidixique a permis l'élimination des bactéries à Gram négatif, il est utilisé dans les travaux de **Takizaw et al. (1993)** pour l'isolement des actinomycètes à partir des milieux marins, **Suzuki et al. (1999)** ont trouvé que les actinomycètes peuvent résistés à l'acide nalidixique jusqu'à une concentration de 10ug/ml, au-delà la croissance de certains genres peut être diminuée.

Une mixture de la nystatine à 50ug/ml et de l'acide nalidixique à 10ug/ml ajoutés au milieu sélectif a permis d'éliminer en grande quantité les contaminants et de sélectionner les actinomycètes.

Le milieu Olson a été complété d'actidione à 40ug/ml qui permet d'éliminer les champignons antagonistes et favorisent le développement des actinomycètes et le propionate de sodium qui est un autre antifongique.

Tableau N°11 : Croissance des souches actinomycétales sur le milieu de base ISP9 contenant la cellulose cristalline (Sigmacell, type 101) comme unique source de carbone et d'énergie.

Souches actinomycétales	Croissance sur le milieu		Souches actinomycétales	Croissance sur le milieu	
	ISP9+cellulose cristalline*			ISP9+cellulose cristalline*	
K1	–		K22	–	
K2	–		K23	–	
K3	±		K24	–	
K4	±		K25	–	
K5	+		S1	–	
K7	–		S2	+	
K8	+		S3	+	
K9	+		S4	–	
K10	±		S5	+	
K11	–		S6	–	
K12	+		C1	+	
K13	–		C2	–	
K14	–		C3	–	
K15	–		G1	–	
K16	–		G2	±	
K18	–		G3	+	
K19	–		G5	±	
K20	+		G6	+	
			G7	±	
K21	–		G8	+	

(–) : Pas de croissance, (±) : Croissance très faible, (+) : Bonne Croissance.

* : Croissance appréciée par rapport au témoin positif (ISP9 contenant le glucose comme seule source de carbone et d'énergie) et le témoin négatif (ISP9 sans source de carbone et d'énergie).

En comparant les deux milieux sélectifs utilisés, le milieu Olson a permis l'isolement du plus grand nombre d'actinomycètes, En effet contrairement au milieu Amidon-Caséine, le milieu Olson a l'avantage d'être transparent ce qui facilite l'observation des colonies apparues.

Malgré les précautions qui ont été prises, la combinaison d'antibiotiques utilisée a permis la croissance de quelques petites colonies de champignons (taille réduite et mycélium peu développé) surtout sur le milieu Amidon-Caséine complété par un seul antifongique par rapport au milieu Olson contenant deux antifongiques. Le problème le plus délicat concerne les bactéries à Gram positif que nous pouvons pas éliminer et qui gênent la croissance des actinomycètes par l'envahissement des géloses, c'est le cas de la présence de plages de *Bacillus*.

Pour les deux milieux utilisés, nous observons une différence importante de la taille de la flore actinomycétale isolée entre les différents échantillons de sols malgré qu'ils sont tous riches en matières organiques et de pH proche de la neutralité. Cette différence peut être expliqué par la présence de substances inhibitrices dans certains de ces sols.

2- Mise en évidence de la biodégradation des composés organiques complexes naturels

2-1- Mise en évidence de la biodégradation de la cellulose (activité cellulolytique)

2-1-1- Résultats

Les résultats de l'utilisation de la cellulose cristalline (Sigmacell, type 101) et de la dégradation du papier Whatman N°1 par les souches actinomycétales figurent dans les **tableaux N°11 et 12**.

Parmi les trente neuf souches actinomycétales isolées et purifiées, **douze** souches (K5, K8, K9, K12, K20, S2, S3, S5, C1, G3, G6, G8) présentent une bonne croissance sur le milieu ISP9 contenant de la cellulose cristalline (Sigmacell, type 101) comme seule source de carbone et d'énergie, tandis que les autres souches présentent une croissance presque nulle ou absente.

Tableau N°12 : Dégradation du papier filtre Whatman N°1 par les souches actinomycétales.

Souches actinomycétales	Dégradation du papier		Souches actinomycétales	Dégradation du papier	
		Whatman N°1			Whatman N°1
K1	-		K22	-	
K2	-		K23	-	
K3	-		K24	-	
K4	-		K25	-	
K5	+		S1	-	
K7	-		S2	+	
K8	-		S3	-	
K9	+		S4	-	
K10	-		S5	+	
K11	-		S6	-	
K12	++		C1	+	
K13	-		C2	-	
K14	-		C3	-	
K15	-		G1	-	
K16	-		G2	-	
K18	-		G3	+	
K19	-		G5	-	
K20	+		G6	++	
K21	-		G7	-	
			G8	+	

(-) : Papier non dégradé, (+) : Papier partiellement dégradé, (++) : Papier complètement dégradé.



A



B

Figure N°11 : Biodégradation du papier filtre Whatman N°1 par la souche S2.

A : témoin ; B : Papier Whatman N°1 dégradé par la souche S2.

À l'exception des souches K8 et S3, toutes les souches présentant une bonne croissance sur le milieu ISP9 à base de cellulose cristalline dégradent le papier filtre Whatman N°1 (**Tableau N°12, Figure N°11**). Parmi elles, **deux** souches (K12 et G6) dégradent totalement ce substrat.

2-1-2- Discussion

La biodégradation de la cellulose par les souches actinomycétales est mise en évidence selon deux méthodes :

La première méthode apprécie l'utilisation de la cellulose comme seule source de carbone et d'énergie par les souches actinomycétales en comparant leur croissance d'une part avec celle obtenue sur le même milieu (ISP9) contenant le glucose comme source de carbone et d'énergie et d'autre part avec celle obtenue sur le milieu ISP9 sans source de carbone et d'énergie.

L'efficacité de cette méthode dans la mise en évidence de biodégradation de la cellulose, repose sur l'utilisation de ce dernier comme unique source de carbone et d'énergie dans le milieu, ainsi, si les souches sont incapables d'utiliser ce substrat, leur croissance est faible ou absente, qui est un indice d'absence d'enzymes cellulolytiques chez ces souches, dans le cas contraire les souches présentant une bonne croissance sont donc capables de dégrader la cellulose et produisent ainsi des enzymes cellulolytiques (**Cellulases**).

Cette méthode a été utilisée par **Lekchiri et al. (2006)** comme un test préliminaire pour la mise en évidence de l'activité cellulolytiques des champignons filamenteux et qui ont trouvés que les souches présentant une bonne croissance sur le milieu cellulose-Agar sont les meilleures souches productrices de cellulase. Une méthode similaire a été utilisée par **Zerizer (2004) et Oulmi (2004)** pour l'identification des actinomycètes isolées des sols et des eaux.

La deuxième méthode utilisée pour tester l'activité cellulolytique des souches isolées, repose sur l'utilisation d'une autre forme de cellulose qui est le papier filtre Whatman N°1 comme unique source de carbone et d'énergie additionné sous forme de bandelettes au milieu de base ISP9 liquide.

Tableau N°13 : Croissance des souches actinomycétales sur le milieu de base ISP9 contenant la pectine comme unique source de carbone et d'énergie.

Souches actinomycétales	Croissance sur le milieu		Souches actinomycétales	Croissance sur le milieu	
	ISP9+pectine*			ISP9+pectine*	
K1	–		K22	–	
K2	–		K23	+	
K3	–		K24	–	
K4	–		K25	+	
K5	–		S1	–	
K7	–		S2	–	
K8	–		S3	+	
K9	–		S4	±	
K10	–		S5	+	
K11	–		S6	+	
K12	±		C1	+	
K13	–		C2	–	
K14	–		C3	–	
K15	–		G1	±	
K16	–		G2	±	
K18	–		G3	+	
K19	±		G5	+	
K20	+		G6	+	
K21	+		G7	+	
			G8	+	

(–) : Pas de croissance, (±) : Croissance très faible, (+) : Bonne croissance.

*: Croissance appréciée par rapport au témoin positif (ISP9 contenant le glucose comme seule source de carbone et d'énergie) et le témoin négatif (ISP9 sans source de carbone et d'énergie).

Contrairement à la première méthode qui détermine l'activité cellulolytique par appréciation de la croissance, cette méthode est plus pratique pour la détection de l'activité cellulolytique qui se traduit par observation directe de la digestion du papier filtre Whatman par les souches actives.

Cette méthode a été utilisée par **Boulahrouf *et al.* (1986)** pour l'étude « in vitro » de la capacité des souches cellulolytiques isolées du tube digestif des lapins et des souris à dégrader divers substrats cellulosiques, elle a été utilisée également par **Hunsa *et al.* (1999)** pour l'isolement des champignons cellulolytiques à partir du sol.

En comparant les résultats des deux méthodes, on observe qu'en plus des dix souches actives sur les deux formes de cellulose, deux autres sont capables d'utiliser uniquement la cellulose sous forme cristalline malgré que cette dernière est réputée moins dégradable que la cellulose amorphe. Ces résultats sont comparables avec ceux obtenus par **Boulahrouf (1988)** qui a trouvé que la cellulose cristalline est plus facilement dégradée par *E.cellulosolvens* que le papier filtre Whatman N°1.

En effet certains souches cellulolytiques possèdent un complexe cellulase associé aux cellules bactériennes, donc pour que le substrat soit dégradé, il faut que la bactérie adhère à celui-ci, ainsi la surface de contact des bandelettes de papier Whatman est largement inférieure à celle des particules de la cellulose cristalline utilisé.

D'autre part on observe que parmi les souches dégradant le papier Whatman, deux souches (K12 et G6) dégradent totalement ce substrat, ce qui peut être apprécié comme une grande capacité cellulolytique.

2-2- Mise en évidence de biodégradation de la pectine (activité pectinolytique)

2-2-1- Résultats

Les résultats de l'activité pectinolytique des souches actinomycétales sont présentés dans les **tableaux N°13 et 14.**

Tableau N°14 : Diamètres des zones claires résultant de la dégradation de la pectine par les souches actinomycétales.

Souches actinomycétales	Diamètres des zones claires (mm)	Souches actinomycétales	Diamètres des zones claires (mm)
K1	0	K22	0
K2	0	K23	12
K3	0	K24	0
K4	0	K25	20
K5	0	S1	0
K7	0	S2	0
K8	0	S3	10
K9	0	S4	0
K10	0	S5	20
K11	0	S6	19
K12	0	C1	20
K13	0	C2	0
K14	0	C3	0
K15	0	G1	0
K16	0	G2	0
K18	0	G3	18
K19	0	G5	20
K20	20	G6	20
K21	18	G7	20
		G8	7

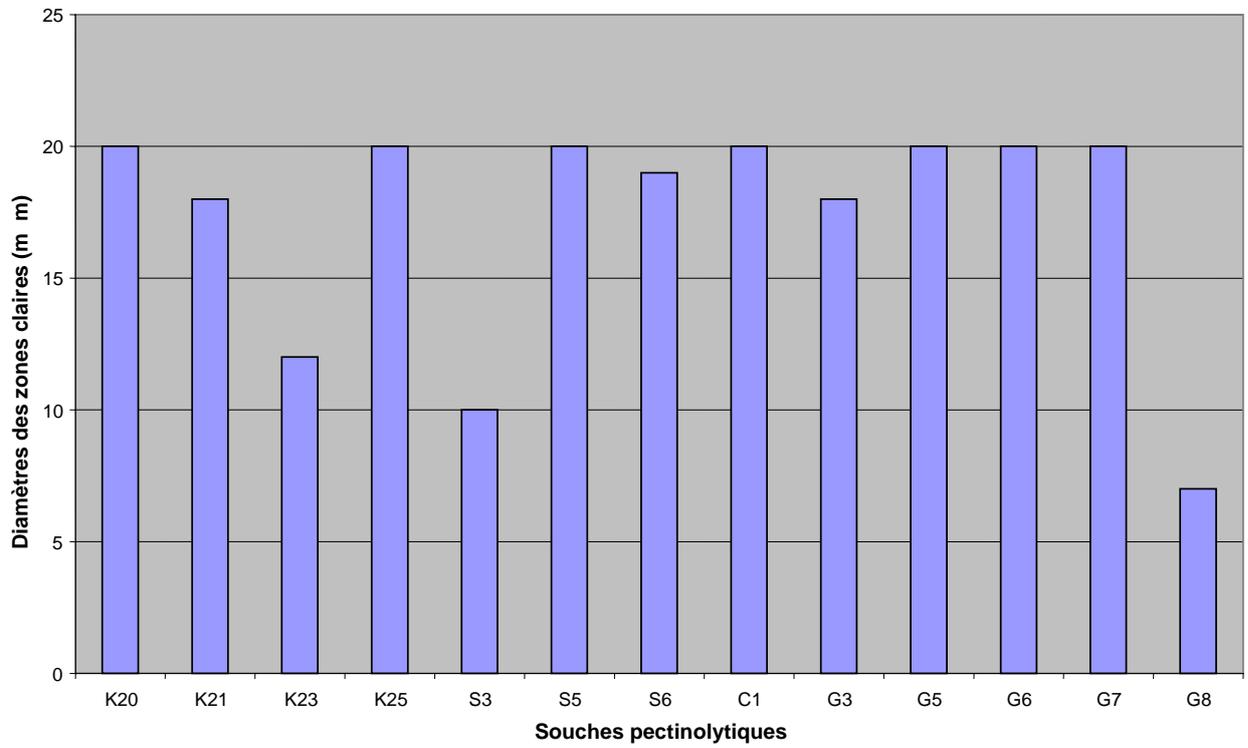


Figure N°12 : Diamètres des zones claires résultant de l'activité pectinolytique.

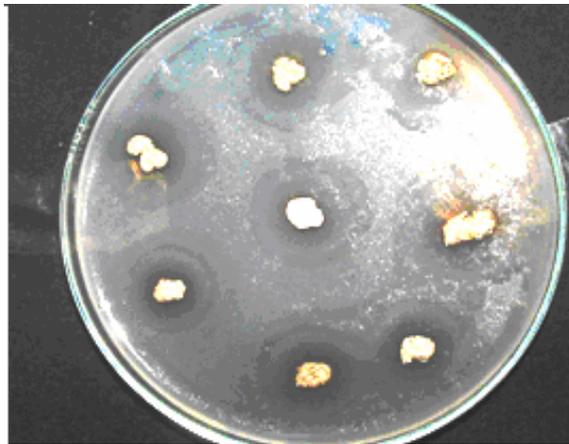


Figure N°13 : Zones claires résultant de l'activité pectinolytique de la souche K25.

D'après ces résultats, **treize** souches (K20, K21, K23, K25, S3, S5, S6, C1, G3, G5, G6, G7 et G8) sur les trente neuf souches isolées présentent une bonne croissance sur le milieu ISP9 à base de pectine de pomme (Fluka AG, CH-9470 Buchs, Asche ~ 2-4%), tandis que les autres souches ne croissent pas ou présentent une très faible croissance.

Toutes les souches ayant une bonne croissance sur milieu ISP9 à base de pectine sont entourées par des zones claires après la couverture des cultures, sur milieu gélosé contenant de la pectine, par le bromure d'héxadécyl triméthyl ammonium (CTAB).

Parmi les treize souches actives, **sept** souches présentent les zones claires les plus importantes ayant 20 millimètres de diamètre (**Figure N°12, 13**).

2-2-2- Discussion

L'activité pectinolytique des souches actinomycétales est mise en évidence par deux méthodes :

La première méthode a le même principe que celle utilisée pour la mise en évidence de l'activité cellulolytique, sauf que la cellulose dans ce cas est remplacée par la pectine comme source de carbone et d'énergie.

Ainsi si les souches sont incapables d'utiliser la pectine, leur croissance est faible ou absente, qui est un indice d'absence d'enzymes pectinolytiques chez ces souches, dans le cas contraire les souches présentant une bonne croissance produisent certainement des enzymes pectinolytiques (**pectinases**).

La deuxième méthode est une technique semi-quantitative qui permet d'estimer l'activité pectinolytique des souches actives en comparant les diamètres des zones claires autour des colonies actives. Le principe de cette méthode est la précipitation de la pectine non hydrolysée sous l'action de CTAB dans le milieu gélosé, la pectine hydrolysée par les enzymes secrétées (pectinases) ne précipite pas, ainsi des zones claires sont apparues autour des colonies actives (**Biely et Slavikova, 1994**).

Tableau N°15 : Croissance des souches d'actinomycètes sur milieu minéral contenant le 2,5-xylénol et le 2,6-xylénol comme seule source de carbone et d'énergie.

Souches actinomycétales	Croissance sur le milieu minéral plus*		Souches actinomycétales	Croissance sur le milieu minéral plus*	
	2,5-xylénol	2,6-xylénol		2,5-xylénol	2,6-xylénol
K1	-	-	K22	-	-
K2	-	-	K23	+	+
K3	-	-	K24	-	-
K4	-	-	K25	+	+
K5	-	-	S1	±	±
K7	±	-	S2	+	±
K8	+	+	S3	-	+
K9	-	-	S4	±	±
K10	-	-	S5	+	±
K11	±	±	S6	-	-
K12	+	+	C1	-	±
K13	-	-	C2	-	±
K14	±	±	C3	-	-
K15	±	±	G1	-	-
K16	±	±	G2	-	-
K18	±	±	G3	+	+
K19	-	-	G5	-	+
K20	±	+	G6	-	+
K21	-	-	G7	-	+
			G8	-	+

(-) : Pas de croissance, (±) : Croissance très faible, (+) : Bonne croissance.

- : Croissance appréciée par rapport au témoin positif (milieu minéral + glucose comme seule source de carbone et d'énergie) et le témoin négatif (milieu minéral sans source de carbone et d'énergie).

Les diamètres des zones claires autour des colonies actives sont différents d'une souche à une autre selon sa capacité d'hydrolyser la pectine, ainsi, plus la capacité pectinolytique de la souche augmente plus le diamètre de la zone claire augmente ce qui est le cas des souches (K20, K25, S5, C1, G5, G6 et G7) qui sont les souches les plus performantes.

Cette méthode a été utilisée par **Biely et Slavikova (1994)** pour la recherche de levures pectinolytiques, elle a été utilisée également par **Aysha et al. (2006)** pour la mise en évidence de la biodégradation de la pectine par les bactéries endophytique et par **Brizzio et al. (2007)** pour la mise en évidence de l'activité pectinolytique des levures isolées à partir des eaux glaciales.

3- Mise en évidence de la biodégradation de composés organiques de synthèse (le 2,5-xylénol et le 2,6-xylénol)

3-1- Résultats

Les résultats de l'utilisation du 2,5-xylénol et du 2,6-xylénol et de la tolérance vis-à-vis de ces mêmes composés organiques par les souches actinomycétales sont présentés dans le **tableau N°15, tableau N°16 et la figure N°14.**

Parmi les trente neuf souches isolées, **sept** souches (K8, K12, K23, K25, S2, S5 et G3) présentent un bon développement sur le milieu minéral contenant le 2,5-xylénol comme seule source de carbone et d'énergie, tandis que les autres souches présentent un développement faible ou absent. Parmi ces sept souches actives, **quatre** souches (K12, K23, K25 et G3) tolèrent le 2,5-xylénol jusqu'à une concentration de 3000mg/l, deux souche (K8 et S2) tolèrent une concentration de 2000mg/l et une souche (S5) tolère une concentration de 1000mg/l.

Concernant le 2,6-xylénol, **onze** souches (K8, K12, K20, K23, K25, S3, G3, G5, G6, G7 et G8) présentent une bonne croissance sur le milieu minéral contenant de 2,6-xylénol comme unique source de carbone et d'énergie. Parmi celles-ci, **six** (K23, K25, G3, G5, G6, G8) tolèrent ce substrat jusqu'à une concentration de 3000mg/l, deux (K8 et S3) à une concentration de 2000mg/l et trois (K12, K20 et G7) à une concentration de 1000mg/l.

Tableau N°16 : Tolérance des souches actives aux 2,5-xylénol et 2,6-xylénol.

Souches actinomycétales	Tolérance au 2,5-xylénol (mg/l)				Tolérance au 2,6-xylénol (mg/l)			
	500	1000	2000	3000	500	1000	2000	3000
K8	+	+	+	-	+	+	+	-
K12	+	+	+	+	+	+	-	-
K20	/	/	/	/	+	+	-	-
K23	+	+	+	+	+	+	+	+
K25	+	+	+	+	+	+	+	+
S2	+	+	+	-	/	/	/	/
S3	/	/	/	/	+	+	+	-
S5	+	+	-	-	/	/	/	/
G3	+	+	+	+	+	+	+	+
G5	/	/	/	/	+	+	+	+
G6	/	/	/	/	+	+	+	+
G7	/	/	/	/	+	+	-	-
G8	/	/	/	/	+	+	+	+

(+) : souche tolérante (pas de zone d'inhibition), (-) : Souche intolérante (présence de zone d'inhibition), (/) : Souche non active sur le substrat.

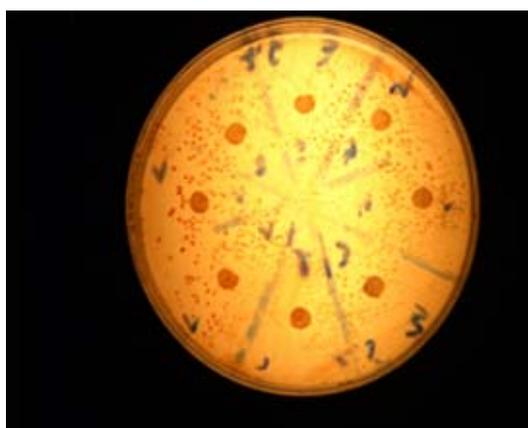


Figure N°14 : Tolérance de la souche K25 au 2,5-xylénol et au 2,6-xylénol jusqu'à une concentration de 3000 mg/l (technique des disques).

3-2- Discussion

La capacité des souches actinomycétales de dégrader le 2,5-xylénol et le 2,6-xylénol est estimée par leur capacité de se développer sur un milieu minéral contenant l'un de ces substrats toxiques comme unique source de carbone et d'énergie.

Ainsi, les souches capables d'utiliser le 2,5-xylénol (K8, K12, K23, K25, S2, S5 et G3) et le 2,6-xylénol (K8, K12, K20, K23, K25, S3, G3, G5, G6, G7 et G8) comme unique source de carbone et d'énergie présentent un bon développement sur le substrat correspondant, qui est un indice de la présence d'enzymes spécifiques pour attaquer ces substrats chez ces souches.

Cette méthode a été utilisée par **Westerberg *et al.* (2000)** pour la mise en évidence de la capacité d'une souche actinomycétale isolé du sol d'utiliser le 4-chlorophénol, par **Evgenia et Victoria (2004)** pour tester la capacité de souches actinomycétales isolées des sols d'Antarctique de croître sur milieu minéral contenant le benzène, le toluène ou le naphthalène comme unique source de carbone et d'énergie, par **Jens *et al.* (1989)** pour l'isolement à partir de sol contaminé par le benzène de souches actinomycétales dégradant le 2,6-xylénol et par **Jung *et al.* (2000)** pour l'isolement à partir de sol des actinomycètes dégradant le 2,4-dinitrophénol.

Les souches présentant un développement très faible ou absent sur ces substrats ne sont pas forcément dépourvues d'enzymes spécifiques pour attaquer ces composés, il est très possible que le composé en question ne puisse être dégradé que par un consortium microbien. En effet **El Aelam et Lebeault (1993)** ont isolé quatre souches de bactéries capables de dégrader le styrène lorsqu'elles sont regroupées mais individuellement, seulement deux souches croissent avec le styrène en tant qu'unique source de carbone. Les deux autres souches sont impliquées dans la dégradation de sous-produit de styrène. Ainsi, un organisme dégrade le composé initial en sous-produits servant alors à l'autre organisme comme source de carbone et ainsi de suite jusqu'à la minéralisation complète du polluant.

La tolérance des souches actives aux deux substrats toxiques est démontrée par la technique des disques. Les disques diffusent alors les xylénols qui inhibent ou non la croissance des souches. Ainsi, les souches entourées d'une zone d'inhibition sont considérées comme sensibles au substrat étudié, dans le cas d'absence de cette zone les souches sont considérées comme tolérantes.

Tableau N°17 : Aspect macroscopique des souches actinomycétales actives.

Souche	MILIEUX											
	ISP2			ISP3			ISP4			ISP5		
	Aspect de la colonie	Couleur du MA	Couleur du MS	Aspect de la colonie	Couleur du MA	Couleur du MS	Aspect de la colonie	Couleur du MA	Couleur du MS	Aspect de la colonie	Couleur du MA	Couleur du MS
K₅	Grnl	blanc	beige	Pdr	vert	marron	Pdr	vert	beige	Pdr	vert	beige
K₈	Pat	–	jaune	Pat	–	beige	Pat	–	marron	Pat	–	beige
K₉	Pat	–	beige									
K₁₂	Pdr	gris	jaune	Pdr	vert	beige	Pdr	gris	beige	Pdr	gris	jaune
K₂₀	Pdr	beige	beige	Pdr	blanc	beige	Pdr	blanc	orangé	Grnl	blanc	beige
K₂₁	Grnl	beige	beige	Grnl	beige	beige	Grnl	blanc	beige	Pdr	vert	marron
K₂₃	Pdr	gris	jaune	Pdr	gris	beige	Pdr	gris	brun	Grnl	gris	brun
K₂₅	Pdr	blanc	brun	Pdr	blanc	blanc	Pdr	vert	beige	Pdr	blanc	brun
C₁	Pdr	blanc	orangé	Grnl	beige	crème	Pdr	orangé	orangé	Pdr	Jaune	Orangé
S₂	Pdr	gris	marron	Pdr	vert	beige	Pdr	vert	beige	Pdr	marron	beige
S₃	Grnl	gris	vert	Pdr	vert	beige	Grnl	gris	beige	Pdr	gris	beige
S₅	Pat	–	jaune	Pat	–	jaune	Grnl	beige	crème	Grnl	gris	jaune
S₆	Pat	–	crème	Pat	–	crème	Pat	–	marron	Pat	–	crème
G₃	Pat	–	jaune	Pat	–	jaune	Pat	–	jaune	Pat	–	marron
G₅	Pat	–	beige	Pat	–	beige	Pat	–	beige	Pat	–	gris
G₆	Pat	–	beige									
G₇	Pat	–	brun	Pat	–	beige	Pat	–	beige	Pat	–	beige
G₈	Pdr	marron	brun	Pdr	blanc	beige	Pdr	blanc	beige	Pdr	blanc	beige

ISP : International *Streptomyces* Project ; MA : Mycélium aérien ; MS : Mycélium du substrat ; Pdr : Poudreux ; Grnl : Granuleux ; Pat : Pâteux.

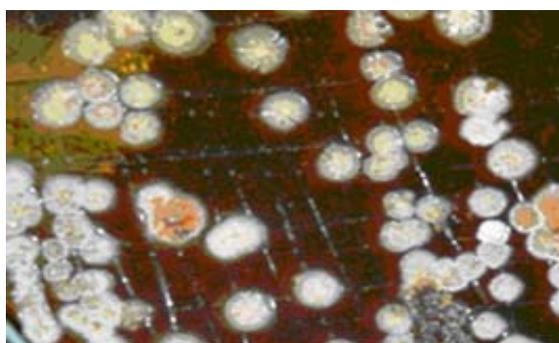


Figure N°15 : Aspect macroscopique de la souche C1 sur milieu ISP2.

Cette technique a été utilisée par **Lebrecque (2003)** pour l'étude de la tolérance des levures (*Kluyveromyces marxianus* et *Saccharomyces cerevisiae*) au xylène, une technique similaire (technique des puits) a été utilisée par **Benimeli et al. (2003)** pour l'étude de la tolérance des actinomycètes isolées des eaux usées aux pesticides organochlorés.

4- Préidentification des souches actives

4-1- Résultat

- **Aspect macroscopique (Tableau N°17)**

Les souches peuvent être réparties en deux groupes en fonction de leur vitesse de croissance, les colonies des souches K5, K8, K9, K12, K20, K21, K23, K25, C1, S2, S3, G6 et G8 apparaissent 2 à 3 jours d'incubation alors que les colonies des souches S5, S6, G3, G5 et G7 requièrent 5 à 7 jours d'incubation pour apparaître.

Pour toutes les souches, les premiers signes de croissance consistent en l'apparition de colonies pâteuses. Au 14^{ème} jour la majorité des souches donnent des colonies poudreuses ou granuleuses de différentes couleurs (blanc, beige, jaune, crème, marron, gris ou vert) (**Figure N°15**), cet aspect est particulier pour les souches développant un mycélium aérien (K5, K12, K20, K21, K23, K25, C1, S2, S3, S5 et G8), les colonies des souches K8, K9, S6, G3, G5, G6 et G7 restent toujours pâteuses.

Au 21^{ème} jours d'incubation, la majorité des souches sont pigmentées, c'est le stade de maturation. L'observation du revers de la colonie, après élimination de l'excès d'Agar permet de déterminer la couleur du mycélium du substrat qui peut être (beige, jaune, crème, orangé, marron ou brun).

Pour la souche K12 des gouttelettes d'eau sont déposées à la surface des colonies, elles apparaissent après la maturation du mycélium aérien.

- **Détermination des pigment mélanoides et diffusibles (Tableau N°18)**

Les pigments mélanoides sont produits par les souches K5, K8, K9, K12, K20, K21 et G8 (**Figure N°16**). Les pigments diffusibles sont produits par les souches C1, S5, S6 et G7, elles sont de couleur jaune pour les souches S5, S6 et G7, et orangée pour la souche C1.

Tableau N°18 : Détermination des pigments mélanoides et diffusibles produit par les souches actinomycétales actives.

Souches	K ₅	K ₈	K ₉	K ₁₂	K ₂₀	K ₂₁	K ₂₃	K ₂₅	C ₁	S ₂	S ₃	S ₅	S ₆	G ₃	G ₅	G ₆	G ₇	G ₈
Pigments mélanoides	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Pigments diffusibles	-	-	-	-	-	-	-	-	Orange	-	-	Jaune	Jaune	-	-	-	Jaune	-

- : Absence de pigment mélanoïde ; + : Présence de pigment mélanoïde.

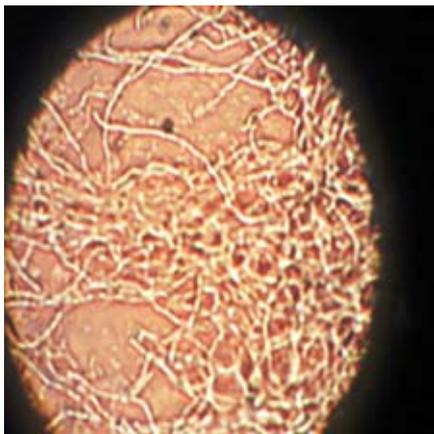


Figure N°16 : Production de pigments mélanoides par la souche K20.

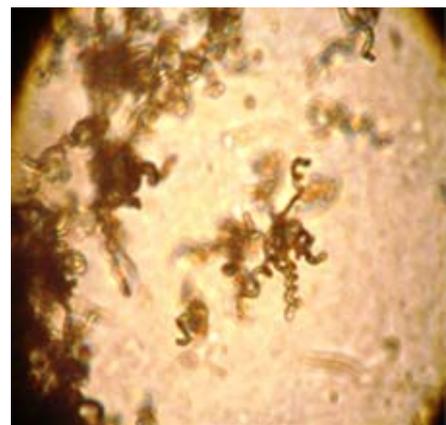
Tableau N° 19 : Aspect microscopique des souches actinomycétales actives

Souches	MS		Forme de chaînes de spores			MA		Forme de la spore	
	frgmt	Sprlt				Longueur de chaînes de spores			
			Droite	Rectiflexible	Spirale	<20	>20	Cylindriques	arrondie
K5	-	-	-	-	+	-	+	+	-
K8	+	+	-	-	-	-	-	-	+
K9	+	+	-	-	-	-	-	-	+
K12	-	-	-	+	-	+	-	+	-
K20	-	-	-	-	+	-	+	+	-
K21	-	-	-	-	+	-	+	+	-
K23	-	-	-	-	+	-	+	+	-
K25	-	-	-	-	+	-	+	+	-
C1	-	-	-	-	+	+	-	+	-
S2	-	-	+	-	-	+	-	+	-
S3	-	-	-	-	+	-	+	+	-
S5	+	-	+	-	-	+	-	-	+
S6	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G3	+	-	-	-	-	-	-	-	-
G5	+	-	-	-	-	-	-	-	-
G6	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G7	+	-	-	-	-	-	-	-	-
G8	-	-	-	+	-	-	+	+	-

MS : Mycélium de substrat ; MA : Mycélium aérien ; frgmt : fragmentation ; Sprlt : sporulation.



A



B

Figure N°17: Aspect microscopique de la souche C1.

A : mycélium de substrat ; B : mycélium aérien (forme spirale des chaînes de spores).

- **Aspect microscopique**

L'étude microscopique des souches actives par la technique des lames et celle des lamelles a donné les résultats rassemblés dans le **tableau N°19**.

Il apparaît que toutes les souches développent un mycélium de substrat qui est fragmenté pour les souches K8, K9, S5, G3, G5 et G7, alors que pour les autres souches, ce mycélium se présente sous forme de longs filaments non fragmentés (**Figure N°17A**).

Parmi les dix huit souches actives seul le mycélium primaire des deux souches K8 et K9 porte des spores qui sont disposées singulièrement (spore unique).

D'autres parts, on constate que à l'exception des souches K8, K9, S6, G3, G5, G6 et G7 toutes les souches développent un mycélium aérien formé d'hyphes dressés sur le mycélium du substrat, ces hyphes aériens sont plus épais et beaucoup moins ramifiés que les hyphes du substrat et portent des chaînes de spores qui sont de forme spirale pour les souches K5, K20, K21, K23, K25, S3 et C1 (**Figure N°17B**), rectiflexible pour les souches K12 et G8 et droite pour les souches S2 et S5, pour les souches K8 et K9 le mycélium de substrat porte des spores disposées singulièrement.

La longueur des chaînes de spores est variable, elle est supérieure à 20 spores par chaîne pour les souches K5, K20, K21, K23, K25, S3 et G8 et inférieure à 20 spores par chaîne pour les souches K12, C1, S2 et S5. La forme des spores est arrondie pour les souche K8, K9 et S5, tandis que pour les autres souches les spores sont de forme cylindrique. Il est a noté aussi qu'aucune autre structure n'est observée comme les sporanges ou les sclérotés.

- **Colorations et caractéristiques biochimiques (Tableau N°20)**

Après coloration de Ziehl-Neelsen, toutes les souches apparaissent sous forme de filaments bleus, à l'exception des souches G3, G5 et G7 qui apparaissent sous forme de filaments rouges.

Tableau N°20 : Colorations et caractéristiques biochimiques des souches actinomycétales actives.

Souches	Colorations		Caractéristiques biochimiques		
	ZN	ZNM	B-Galactosidase	Nitrate-Reductase	Catalase
K5	-	-	ND	+	+
K8	-	-	ND	+	+
K9	-	-	ND	+	+
K12	-	-	ND	+	+
K20	-	-	ND	+	+
K21	-	-	ND	+	+
K23	-	-	ND	+	+
K25	-	-	ND	+	+
C1	-	-	ND	+	+
S2	-	-	ND	+	+
S3	-	-	ND	+	+
S5	-	+	+	+	+
S6	-	+	-	-	+
G3	+	+	-	+	+
G5	+	+	-	+	+
G6	-	-	ND	+	+
G7	+	+	-	+	+
G8	-	-	ND	+	+

ZN : Ziehl-Neelsen ; ZNM : Ziehl-Neelsen modifiée ; ND : non déterminé.

Tableau N°21: Caractères physiologiques des souches actinomycétales actives.

Souches	T _{Opt} (°C)	pH _{Opt}	Type respiratoire	Mobilité	Résistance au lysosyme
K5	28	7	aérobie	–	ND
K8	30-37	7,5	Anaérobie facultatif	–	ND
K9	30-37	7,5	Anaérobie facultatif	–	ND
K12	28	7,5	aérobie	–	ND
K20	30	7,5	aérobie	–	ND
K21	30	7	aérobie	–	ND
K23	30	7,5	aérobie	–	ND
K25	28	7,5	aérobie	–	ND
C1	37	7	aérobie	–	ND
S2	30	7,5	aérobie	–	ND
S3	30	7,5	aérobie	–	ND
S5	30	8	aérobie	–	R
S6	37	7	aérobie	–	S
G3	30-37	7,5	aérobie	–	S
G5	30	8	aérobie Anaérobie	–	S
G6	28	6,5	facultatif	+	ND
G7	30	7	aérobie	–	S
G8	28	6,5	aérobie	–	ND

T_{Opt} : température optimal de croissance ; pH_{Opt} : pH optimal de croissance ; – : test négatif ; + : test positif ; S : sensible ; R : résistante ; ND : non déterminer.



Figure N°18 : Sensibilité de la souche S6 au lysosyme.

Après coloration de Ziehl-Neelsen modifiée, en plus des souches G3, G5 et G7 qui apparaissent sous forme de filaments rouges, les deux souches S5 et S6 apparaissent sous forme de filaments roses tandis que toutes les autres souches apparaissent sous forme de filaments bleus.

Toutes les souches possèdent une catalase. À l'exception de la souche S6 dépourvue d'une nitrate réductase, toutes les autres souches possèdent cette enzyme. La β -Galactosidase est présente chez une seule souche acido-alcool-résistante (S5).

- **Caractères physiologiques**

D'après les résultats rassemblés dans le **tableau N°21**, les dix huit souches actives présentent un optimum de croissance à des températures moyenne allant de 28°C à 37°C et à des pH allant de 6,5 à 8. À l'exception de la souche G6 qui est mobile toutes les autres souches sont immobiles. Parmi les dix huit souches actives, les souches K8, K9 et G6 sont anaérobies facultatifs tandis que les autres souches sont tous aérobies. Les souches S6, G3, G5 et G7 sont sensibles au lysosyme (**Figure N°18**), une seule souche (S5) est résistante au lysosyme.

4-2- Discussion

L'étude des caractéristiques morphologiques, macroscopiques et microscopiques des souches actinomycétales est largement utilisée pour caractériser les genres des actinomycètes.

Selon **Shirling et Gottlieb (1976)** l'identification des actinomycètes repose en grande partie sur les caractéristiques morphologiques qui sont considérées comme des caractères stables. Certains genres d'actinomycètes (*Streptomyces*, *Streptoverticillium*, *micromonospora*, *microbispora*...) peuvent être identifiées avec un plus grand degré de précision par rapport aux autres genres (*Nocardia*, *Actinomadura*...) par simple observation microscopique (**Williams et al., 1993**).

Plusieurs auteurs ont pu déterminer les genres des actinomycètes à partir des caractéristiques morphologiques comme **Zaitlin et al. (2003)** dont les travaux ont permis d'identifier le genre par simple observation microscopique d'une souche actinomycétale cultivée sur un seul milieu Czapek. D'autres ont identifié des genres actinomycétales par observation des chaînes de spores au microscope optique (**Balagurunathan et al., 1996**).

En plus des caractères morphologiques, les colorations cellulaires, les caractères biochimiques et physiologiques sont d'une grande importance dans la caractérisation des genres d'actinomycètes avec

une plus grande précision, ils sont largement utilisés aux laboratoires cliniques pour la recherche des actinomycètes pathogènes (**Boiron et al., 1993 ; Carlotti et al., 1994**).

Les critères de détermination que nous avons utilisés sont essentiellement ceux de la classification « **Taxonomie Outline of The Procaryotes, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2004** », d'autres critères sont pris à partir de « **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 1994** ».

Sur tous les milieux ISP la croissance des souches actinomycétales débute par la formation d'un mycélium pâteux et ramifié, c'est le mycélium de substrat.

Les souches K8, K9, S6, G3, G5, G6 et G7 conservent leur aspect pâteux même après maturation, tandis que les autres souches développent un aspect poudreux ou granuleux correspondant au mycélium aérien. Le mécanisme de la morphogenèse a fait l'objet d'une étude réalisée par **Sprusanky et al. (2003) et Kim et al. (2005)** sur *Streptomyces coelicolor*, il s'est avéré qu'une fois les sources nutritionnelles du milieu sont épuisées, il y a libération de petites molécules à partir du mycélium du substrat, la libération de ces signaux chimiques déclenche un programme d'expression de gènes démontré par l'apparition d'un mycélium aérien.

Pour la souche K12, des gouttelettes d'eau se sont disposées à la surface des colonies, d'après **Larpen et Larpen-gourgaud (1985b)** les gouttelettes d'eau observées sur les colonies des actinomycètes sont des gouttelettes de sudation. **Thompson et al. (2002)** ont montré que les gouttelettes d'eau bleues apparues sur les colonies de *Streptomyces coelicolor*, contiennent de l'actinorhodine, antibiotique diffusé également dans le milieu.

Parmi les dix huit souches actives quatre souches (C1, S5, S6 et G7) produisent des pigments solubles, ils sont de couleur orangée pour la souche C1 et jaune pour les souches S5, S6 et G7.

Ces pigments peuvent être des substances bioactives, **Margalith (1992)** rapporte que les actinomycètes produisent des métabolites bioactifs pigmentés. **Horinouchi et Beppu (1994)** ont rapporté aussi que la streptomycine produite par *Streptomyces griseus* est un pigment jaune.

Les souches K5, K8, K9, K12, K20, K21 et G8 secrètent un pigment brun noir qui est la mélanine, la production des pigments mélanoides est une caractéristique très importante pour les actinomycètes, **Shirling et Gottlieb (1972)** l'ont considérés comme une clé pour la classification des *Streptomyces*. Selon **Margalith (1992)** la biosynthèse de la mélanine se fait par la voie de Raper-Mason avec la tyrosine comme substrat, la tyrosinase catalyse la réaction d'oxydation de la tyrosine en

DOPA (dihydroxyphénylalanine) et en dopaquinone. Après une série de réaction d'auto-oxydation le produit final est l'acide 5,6-dihydroxyindol coloré en jaune, qui se condense pour donner la mélanine caractérisée par la couleur noir.

D'autre part, il est possible que certains pigments de couleur foncée masquent les autres pigments de couleurs plus claires qui sont produits simultanément, **Omura et al. (2001)** ont rapporté que le génome de *Streptomyces overmitilis* code pour 25 métabolites secondaires (mélanine, caroténoïdes, siderophores ect.).

Les souches K5, K12, K20, K21, K23, K25, C1, S2, S3 et G8 développent des colonies après 48 heures d'incubation, c'est une caractéristique des actinomycètes à croissance rapide, en effet **Nodwel et Losick (1998)** ont constaté que les colonies de *Streptomyces coelicolor* érigent les hyphes aériens en 24 heures. Ces souches à croissance rapide peuvent être donc rapprochées au genre *Streptomyces*.

Cette classification est confirmée d'une part par l'aspect des colonies, elles sont rondes, poudreuses et légèrement enfoncées dans la gélose et d'autre part par la forme des chaînes de spores qui sont de forme spirale, droite ou rectiflexible, selon **Myadoh et al. (2002)** ces formes sont typique des *Streptomyces*, à cela s'ajoute la forme cylindrique des spores qui selon **Ezra et al. (2004)** caractérise le genre *Streptomyces*. En plus ces souches présentent un optimum de croissance à des température allant de 28 à 37°C et à des pH allant de 6,5 à 7,5, elles sont aérobies, immobiles, non acido-alcool- résistantes, catalase positif et possèdent une nitrate réductase qui selon **Michel et Thierry (1994)** sont des caractères exclusives des Streptomycètes.

Les colonies des souches K8, K9 et G6 apparaissent après 2 à 3 jours d'incubation mais elles présentent des caractéristiques différentes de celles des *Streptomyces*.

Les souches K8 et K9 sont dépourvu d'un mycélium aérien et présentent un mycélium de substrat branché et fragmenté portant des spores arrondies séparées singulièrement (sous forme de spore unique), ce caractère suffit pour classer ces deux souches au genre *Micromonospora*. En effet **Singh (1999)** a pu classé des actinomycètes isolées d'un sol du mont Evrest au genre *Micromonospora* en se basant uniquement sur des caractères morphologiques.

En plus ces deux souches présentent un optimum de croissance à des température allant de 30 à 37°C et à un pH de 7,5, elles sont anaérobies facultatives, immobiles, non acido-alcool résistantes, catalase positif et possèdent une nitrate réductase, qui sont des caractères compatibles avec ce genre actinomycète.

La souche G6 se caractérise par la présence d'un mycélium primaire très branché non fragmenté mais absence d'un vrai mycélium aérien, parmi toutes les souches actives seule cette souche est mobile qui est un caractère exclusif du genre *Cellulomonas*, en plus elle présente un optimum de croissance à une température de 28°C et à un pH de 6,5, elle est non acido-alcool résistante, anaérobie facultative, cellulolytique, nitrate réductase positive et catalase positive, tous ces caractères permettent de rapprocher cette souche au genre *Cellulomonas*.

Les colonies des souches S5, S6, G3, G5 et G7 apparaissent après 5 à 7 jours d'incubation, c'est une caractéristique des actinomycètes à croissance lente. D'après **Perry et al. (2004)** les actinomycètes produisant les acides mycoliques dans leur paroi se développent lentement à cause de l'hydrophobicité de ces acides qui forme un obstacle à l'absorption des nutriments solubles.

Fiss et Brooks (1991) ont rapporté que les actinomycètes produisant les acides mycoliques sont *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Gordonia*, *Rhodococcus* et *Tsukamurella*.

Ces souches présentent un optimum de croissance à des pH allant de 7 à 8 et à des température allant de 30 à 37°C, En effet **McNeil et al. (1994)** ont constaté que les souches appartenant au genre *Nocardia* présentent un optimum de croissance à 35°C.

Les souches G3, G5 et G7 sont dépourvus d'un mycélium aérien et possèdent un mycélium de substrat branché et fragmenté, après coloration de Ziehl-Neelsen ces trois souches apparaissent sous microscope optique (Gx100) sous forme de filaments rouges, elles sont donc acido-alcool résistances qui est une propriété exclusive du genre *Mycobacterium*. En plus ces trois souches possèdent une nitrate réductase, une catalase mais pas une β -Galactosidase et elles sont sensibles

au lysosyme, aérobies et immobiles, qui sont caractéristiques du genre *Mycobacterium* (**Boiron et al., 1993, Carlotti et al., 1994**).

Après coloration de Ziehl-Neelsen modifiée, les deux souches S5 et S6 apparaissent sous microscope optique (GX100) sous forme de filaments roses, elles sont donc partiellement acido-alcool résistances. Cette coloration est largement utilisée pour la recherche de *Nocardia* et genres apparentés. **Mishra et al. (1980)** l'ont employée pour différencier les *Nocardia* des autres genres actinomycétales.

La souche S5 possède un mycélium aérien très réduit qui porte de courtes chaînes de spores et un mycélium de substrat branché et fragmenté, elle possède une nitrate réductase, une β -Galactosidase et une catalase, elle est résistante au lysosyme, immobile et aérobie, tous ces caractères permettent de rapprocher cette souche au genre *Nocardia* (Boiron *et al.*, 1993 ; Carlotti *et al.*, 1994).

À la différence de la souche S5, la souche S6 est dépourvu d'un mycélium aérien, elle ne possède ni nitrate réductase, ni β -galactosidase et elle est sensible au lysosyme ce qui rapproche cette souche au genre *Rhodococcus* (Boiron *et al.*, 1993 ; Carlotti *et al.*, 1994).

Discussion générale

Tableau N°22 : Récapitulatif des souches actives sur les composés organiques étudiés

Souche / Composé organique	K5	K8	K9	K12	K20	K21	K23	K25	C1	S2	S3	S5	S6	G3	G5	G6	G7	G8
	Cellulose	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-
Pectine	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
2,5-xylénol	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-
2,6-xylénol	-	+	-	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+

+ : composé dégradé par la souche, - : composé non dégradé par la souche.

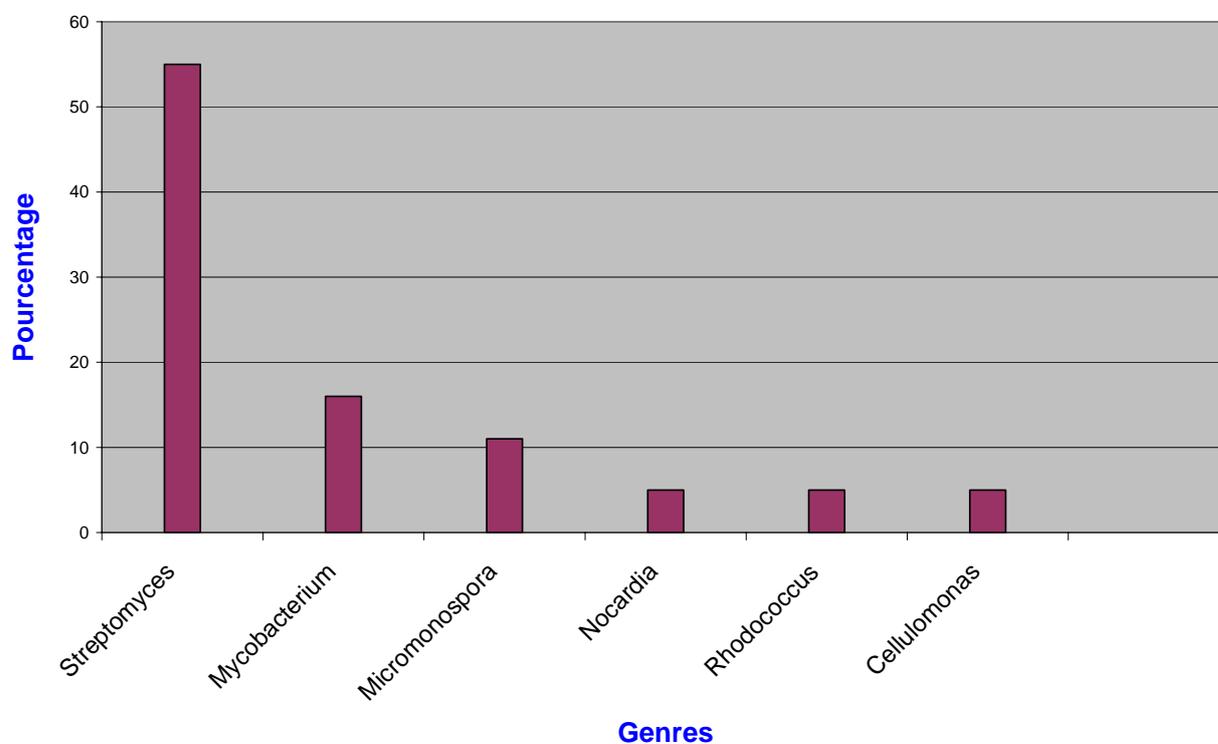


Figure N°19 : Pourcentage des différents genres des souches actinomycétales actives.

Sur l'ensemble des trente neuf souches actinomycétales isolées, dix huit souches présentent une activité de biodégradation sur au moins l'un des substrats organiques étudiés, une seule souche est capable d'utiliser ces quatre composés (**Tableau N°22**).

La proportion des souches appartenant au genre *Streptomyces* est de **55,55%**(**Figure N°19**), (soit 10 souches sur 18), parmi celles-ci, sept sont cellulolytiques, sept pectinolytiques, quatre et six utilise respectivement le 2,5-xylénol et le 2,6-xylénol comme unique source de carbone et d'énergie. Parmi ces souches, il y a celles qui dégradent 2 substrats ou plus.

Les Streptomycètes sont largement impliquée dans le processus de biodégradation de composés organiques aussi bien naturels que synthétiques, de ce fait beaucoup d'espèce appartenant à ce genre ont été isolées et étudiées. C'est le cas de *Streptomyces.sp* isolé des sols iraqien doté d'une grande activité cellulolytique (**Al-Tai et al., 1989**), *Streptomyces lydicus* isolé des sédiment marins de l'inde et ayant un grand potentiel de production des polygalacturonases (**Nicemol et al., 2006**), *Streptomyces.sp* capable de croître sur les pesticides organochlorés (**Benimeli et al., 2003**) et une autre capable de dégrader le diuron, herbicide largement utilisé en agriculture (**Castillo et al., 2006**).

La proportion des souches appartenant au genre *Mycobacterium* est de **16,66%** (soit 3 souches sur 18). Parmi les dix huit souches actives, seule la souche G3 qui appartient à ce genre est capable d'utiliser les quatre composés organiques étudiés, ce qui montre la versatilité métabolique très importante de ce genre d'actinomycètes.

En effet **Mrozik et al. (2003)** ont montré que la majorité des isolats capable de croître sur les PAHs appartiennent au genre *Mycobacterium*, d'autres parts plusieurs espèces appartenant à ce genre sont aussi capable de dégrader les tri-, tetra- et penta-chlorophénols (**Apajahlahti et Salkonoja-Salonen, 1987 ; Haggblom et al., 1988**), d'autres études ont montré le rôle important de ce genre dans la dégradation du toluène (**Tay et al., 2001**) et du 2,6-xylénol (**Jens et al., 1989**).

La proportion des souches appartenant au genre *Micromonospora* est de **11,11%** (soit 2 souches sur 18). À la différence de la souche K9 qui dégrade seulement la cellulose, la souche K8 est capable de dégrader 3 substrats (cellulose, 2,5-xylénol et 2,6-xylénol).

En effet les *Micromonosporacea* participent dans la dégradation d'un large spectre de composés organiques naturels tel que la pectine et le xylane (**Demain et Solomon, 1985**) et

synthétiques tel que le benzène, le toluène et le naphthalène (**Evgenia and Victoria., 2004**) ainsi que les gommés cis-1,4-polyisoprène (**Alexandros et al., 2000**).

Les genres *Nocardia*, *Rhodococcus* et *Cellulomonas* constituent chacun **5,55%** des actinomycètes actives. Ces trois genres sont très réputés pour leur pouvoir dégradant des composés organiques.

En effet **Tibbles et al. (1989)** ont isolés quatre espèces de bactéries mésophiles qui utilisent le phénol comme seule source de carbone et d'énergie, parmi eux une souche appartient au genre *Nocardia*.

De nombreuses espèces isolées du genre *Rhodococcus* dégradent un large spectre de composés organiques. Par exemple, *R.opacus* SAO101 est capable de croître sur le phénol, le benzène, le 4-nitrophénol, le biphényl, le naphthalène, le dibenzofuran et le dibenzo-p-dioxin (**Kimura et Urushigawa, 2001**). *R.opacus* M213 dégrade le naphthalène, le toluène, le phénol et l'hydroxybenzoate (**Uz et al., 2000**).

Hale boothe et al. (2001) en présentant une étude sur les microorganismes aérobies de lixiviat afin d'évaluer l'écologie microbienne lors de processus de biorémédiation mettent en évidence différentes populations cultivables. Parmi les bactéries à Gram positif identifiées **Hale boothe et al. (2001)** rapportent la présence d'une espèce de *Cellulomonas*.

D'autres parts **Bagnara et al. (1985)** rapportent une espèce de *Cellulomonas* issue de décharges (*Cellulomonas cellulans*) pouvant se développer aussi bien en conditions aérobies qu'anaérobies.

Conclusion et perspectives

Depuis plusieurs années, la dépollution et la valorisation des déchets agricoles et agroindustriels constituent des thèmes de recherches principaux des microbiologistes.

Pour cela nous nous sommes fixés comme objectifs d'isoler à partir de sol des souches actinomycétales capables de dégrader certains composés organiques naturels (la cellulose et les substances pectiques) ou xénobiotiques (le 2,5-xylénol et le 2,6-xylénol).

De ce fait, quatre échantillons de sols dont deux sols agricoles (Ain-El-karma et Sissaoui) et deux forestiers (Djebel-El-Ouahch et Chaab-Rssas), ont été prélevés, à partir de ceux-ci deux milieux sélectifs (Amidon-Caséine et Olson) additionnés d'antibiotiques ont été ensemencés, ainsi, trente neuf souches actinomycétales ont été isolées et purifiées.

La mise en évidence de l'activité cellulolytique des actinomycètes isolées est effectuée selon deux méthodes dont chacune utilise une forme différente de cellulose (cristalline pour la première méthode et papier Whatman n°1 pour la deuxième méthode) comme unique source de carbone et d'énergie. L'utilisation de la cellulose est appréciée par la capacité des souches à se développer sur le milieu de base ISP9 à base de cellulose pour la première méthode et par la digestibilité du papier whatman N°1 pour la deuxième méthode. Sur l'ensemble des trente neuf souches isolées, douze sont douées d'une activité cellulolytique.

La mise en évidence de la biodégradation des substances pectiques par les souches isolées est effectuée également par deux méthodes, l'utilisation de la pectine par ces souches est appréciée par leur capacité à croître sur le milieu de base ISP9 à base de pectine pour la première méthode et par l'apparition de zones claires au tours des colonies actives après la couverture des cultures sur le milieu pectine agar par le CTAB pour la deuxième méthode. Ainsi, parmi les trente neuf souches actinomycétales isolées treize présentent une activité pectinolytique.

L'utilisation du 2,5-xylénol et du 2,6-xylénol par les souches isolées est appréciée par leur capacité à se développer sur un milieu minéral additionné du 2,5-xylénol ou du 2,6-xylénol en tant qu'unique source de carbone et d'énergie. La tolérance des souches actives vis à vis des deux substrats est effectuée par la technique de diffusion sur gélose (technique des disques). Ainsi, sur l'ensemble des trente neuf souches isolées, sept sont capable d'utiliser le 2,5-xylénol dont quatre

tolèrent de fortes concentrations de celui-ci (jusqu'à 3000mg/l) et onze utilisent le 2,6-xylénol comme unique source de carbone et d'énergie dont six tolèrent de fortes concentrations de celui-ci (jusqu'à 3000mg/l).

Ainsi on peut conclure que sur l'ensemble des trente neuf souches actinomycétales isolées, dix huit souches présentent une activité de biodégradation sur au moins l'un des substrats organiques étudiés, une seule souche est capable d'utiliser ces quatre composés.

L'étude des caractéristiques morphologiques, physiologiques, biochimiques et des colorations cellulaires, a permis de rapprocher dix des souches actives au genre *Streptomyces*, trois au genre *Mycobacterium*, deux au genre *Micromonospora*, une au genre *Nocardia*, une au genre *Rhodococcus* et une au genre *Cellulomonas*.

L'importance de ces souches sur le plan de biotechnologie nous a orienté de fixer les objectifs suivants :

- Confirmer l'identification de ces souches par des tests chimiotaxonomiques et des analyses phylogénétiques.
- Extraire et purifier les molécules bioactives produites (enzymes).
- Etude des propriétés physico-chimique et la cinétique de ces enzymes.
- L'utilisation de ces enzymes dans les domaines de biotechnologie (industrie alimentaire, textile, dépollution biologique,...).

Références bibliographiques

- Agate A. D., M. H. Bilimoria. and J. V. Bhat. (1962).** Pectin transeliminase activity in *Streptomyces viridochromogenes*. *curr. Sci.* **31**, 462-463.
- Alexander M. and Lustigman B.K. (1966).** Effect of chemical structure on microbial degradation of substituted benzenes, *J Agric Food Chem.* **14**, 410-413.
- Alexander M. (1973).** Non biodegradable and other recalcitrant molecules. *Biotechnol. Bioeng.* **15**, 611-615.
- Alexandro L., Exandros L., Mahmoud M.B., Rudolf R., Ulrike K., Jurgen S., Hans C. Fleming L. Reiner M., Kroppensted T. and Alexander S.C. (2000).** Biodegradation of *cis*-1,4-Polyisoprene Rubbers by Distinct Actinomycetes: Microbial Strategies and Detailed Surface Analysis. *Appl. Environm. Microbiol.* **4(66)**, 1639–1645.
- Aleshchenkova Z. M., Samsonova AS., Baikova SV., Kukulianskaia TA. (1996).** The degradation of plasticizers by *Rhodococcus erythropolis* 40F. *Mikrobiol. Z.* **58**, 34-38.
- Al-Tai A.M., Abdul-Razzak S., Al-Attayah S.S. and Abdul-Nour B. (1989).** Cellulase production from actinomycetes isolated from Iraqi soils. *J. Islam. Acad. Sci.* **2(3)**, 185-188.
- Apajalahti J. H., Salkinoja-Salonen M. S. (1987).** Dechlorination and para-hydroxylation of polychlorinated phenols by *Rhodococcus chlorophenolicus*. *J. Bacteriol.* **169**, 675–681.
- Arenskötter M., Broker D., Steinbuchel A. (2004).** Biology of the metabolically diverse genus *Gordonia*. *Appl. Environm. Microbiol.* **70**, 3195-3204.
- Atlas R.M. (1988).** Principles of microbiology, Ed. Mosby, 1994.
- Aysha J.I.C., Edweis Candida B. and José D.G.V. (2006).** Enzymatic activity of endophytic bacterial isolates of *Jacaranda decurrens* Cham. (Carobinha-do-campo). *Braz. Arch. Biol. Technol.* **3(49)**, 353-359.
- Bagnara C., Toci R., Gaudin C. and Belaich J.P. (1985).** Isolation and characterization of a cellulolytic microorganism, *Cellulomonas fermentans* sp. nov.. *Int. J. Syst. Bact.* **35**, 502-507.
- Balagurunathan R., Xu L. and Jiang C. (1996).** Diversity of Actinomycetes from south India and south China. *Actinomycetes.* **4(3)**, 89-94.
- Bell K. S., Philp J. C., Aw DWJ., Christofi N. (1998).** The genus *Rhodococcus*. *J. Appl. Microbiol.* **85**, 195–210.
- Benimeli C. S., Amoroso M. J., Chaile A. P., Castro G. R. (2003).** Isolation of four aquatic *streptomyces* strains capable of growth on organochlorine pesticides. *Biores Technol.* **89**, 133-138.
- Beppu T. (1986).** Regulatory substances and genes for differentiation and antibiotic synthesis in actinomycetes. In: *Biological, Biochemical and Biomedical Aspects of actinomycetes*. Eds: G. Szabo, S. Biro, M. Goodfellow. Akademiai kiado, Budapest. 15-23.

- Beppu T. (1992).** Secondary metabolites as chemical signals for cellular differentiation. *Genes*. **115**, 159-165.
- Biely P. and Slavikova E. (1994).** New search for pectolytic yeasts. *Folia Microbiol.* **6(39)**, 485-488.
- Boiron P., Provost F., Dupont B. (1993).** Méthodes de laboratoire pour le diagnostic de la nocardiose. Institut Pasteur, Collection "Commission des laboratoires de référence et d'expertise de l'Institut Pasteur", Paris. 180.
- Bollag J. M. (1974).** Microbial Transformation of Pesticides. *Adv. Appl. Microbiol.* **18**, 75-130.
- Bossert I. D. and Kosson D.S. (1997).** Methods for Mesuring Hydrocarbon Biodegradatooon in Soils. In *Manual of Environmental Microbiology*. Eds : Hurst C.J. *et al.* ASM Press, 1997.
- Boulahrouf A., Fonty G. et Gouet P. (1986).** Study of plant cell wall polysaccharides degrading bacteria in the digestive tract of rabbitt and mice. In: "Proceeding of International Seminary on biology of anaerobic bacteria." Eds : Dubourguier H.C. Edition Elsevier-Amsterdam.
- Boulahrouf A. (1988).** La microflore responsable de la dégradation des polyosides pariétaux dans le gros intestin de la souris et du lapin. Thèse de doctorat. Université de Clermont-Ferrand II.
- Bousseboua H. (2002).** Microbiologie générale. Ed. Université Mentouri Constantine, 240.
- Briglia M., Rainey FA., Stackebrandt E., Schraa G. and Salkinoja-Salonen M. S. (1996).** *Rhodococcus percolatus* sp. nov., a bacterium degrading 2,4,6-trichlorophenol. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **46**, 23-30.
- Brizzio S., Turchetti B., De Garcia V., Libkind D., Buzzini P. and Van Brook M. (2007).** Extracellular enzymatic activities of basidiomycetous yeasts isolated from glacial and subglacial waters of northwest Patagonia (Argentina). *Can. J. Microbiol.* **53**, 519-525.
- Bruhlmann F., Kim K.S., Zimmerman W. and Fiechter A. (1994).** Pectinolytic enzymes from actinomycetes for the degumming of ramie bast fibers. *Appl and Environm Microbiol.* **6(60)**, 2107-2112.
- Callahan M. A., Salimak., Gebel N., May I., Floncer C., Freed R., Jennigs P.,Whimore F., Holt B. and Gould G. (1982).** Water Related Environment. Fate of 129 Priority pollutants, E.P.A, a,b, NTIS. 29-79- 4401.
- Carelotti A., Boiron P., Provost P. et Villard J. (1994).** *Nocardia* et bactéries apparentées. In : Manuel de Bactériologie clinique. Eds: J. Freney F. Renauld W. Hansen et C. Bollet. 2^{ème} éd. **2**, 811-831.
- Castillo A.M., Felis N., Aragon P., Cuesta G. and Sabater C. (2006).** Biodegradation of the herbicide diuron by Streptomycetes isolated from soil. *Internt biodeter and biodegrd.* **58**, 196-202.
- Cavala M. and Eberlin T. (1994).** Isolement des streptomycètes du sol. *L'opéron.* **4**, 13-17.
- Cerniglia C.E. (1992).** Biodegradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Biodegradation.* **3**, 351-368.
- Chandra R. and Rustgi R. (1998).** Biodegradable polymers, *Prog. Polym. Sci.* **23**, 1273–335.

- Chapman P. J. (1972).** An outline of reaction sequences used for the bacterial degradation of phenol compounds, In: Degradation of synthetic organic molecules in the biosphere. *National Academy of Sciences, Washington, D.C.* 17-55.
- Chapman P. J. and D.J. Hopper. (1968).** The bacterial metabolism of 2, 4-xyleneol. *Biochem. J.* **110**, 491-498.
- Chater K.F., Merrick M.J. (1979).** Streptomycetes, in: *Developmental Biology of prokaryotes. Ed : J.H. PARISH.* University of California press, Berkeley and Los Angeles. 93-114.
- Chatterjee S. and Dutta T.K. (2003).** Metabolism of butyl benzyl phthalate by *Gordonia* sp. strain MTCC 4818. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **309**, 36-43.
- Chatterjee S., Mallick S., Dutta TK. (2005).** Pathways in the degradation of hydrolyzed alcohols of butyl benzyl phthalate in metabolically diverse *Gordonia* sp. strain MTCC 4818. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **9**, 110-120.
- Chitte R.R., Nalawade V.K. and Dey S. (1999).** Keratinolytic activity from the broth of a feather-degrading thermophilic *Streptomyces thermoviolaceus* strain SD8. *Lett. Appl. Microbiol.* **28**, 131-136.
- Cho S., Devries J.W. and Prosky L. (1997).** Dietary Fiber Analysis and Applications. Gaithersburg, MD: AOAC International.
- Chun J., Youn H. D., Yim Y. I., Lee H., Kim. M. Y., Hah Y.C. and Kang S.O. (1997).** *Streptomyces seoulensis* sp. Nov. *Int., J. Syst. Bacteriol.* **47**, 492-498.
- Chaun J., Seong C. N., Bae S. K., Lee K. J., Kang S. O., Goodfellow M. and Hah Y. C. (1998).** *Nocardia flavospora* sp. nov. *Inter. J. Syst. Bacteriol.* **48**, 901-905.
- Collins M.D., Pirouz T., Goodfellow M., Minnikin D.E. (1977).** Distribution of menaquinones in actinomycetes and corynebacteria. *Gen. Microbiol.* **100**, 221-230.
- Crawford D. L., Lynch J. M. and Ousley M.A. (1993).** Isolation and characterisation of actinomycetes antagonists of a fungal root pathogen. *Appl. Environm. Microbiol.* **59(11)**, 3899-3905.
- Dalton H. et Stirling, D.I. (1982).** Co-metabolism. *Phil. Trans. Roy. Soc. Lond.* **297**, 481-496.
- Demain A.L. and Solomon N.A. (1985).** Biology of industrial microorganisms. The Benjamin/Cummings publishing company, Inc. 291-357.
- Dierckx S. and Dewettinck K. (2002).** Seed gums. In : *Biopolymers. Polysaccharides II.* Eds : Vandamme E.J., De Baets S., Steinbüchel A. Weinheim, Germany. **6**, 321-343.
- Dulaney E.L., Larsen H.A. and Stapley E.O. (1955).** A note on the isolation of microorganisms from natural sources. *Mycol.* **47**, 420.
- El Aalam S. et Lebeault J.M. (1993).** High efficiency styrene biodegradation in a biphasic organic/water continuous reactor. *Appl Microbiol Biotechnol.* **39**, 696-699.
- Ensign J.C. (1978).** Formation, properties and germination of actinomycetes spores. *Annus. Rev. Microbiol.* **32**, 185-219.

- Ensign J.C., Normand p., Burden J.P. and Yallop C.A. (1993).** Physiology of some actinomycetes genera. *Rev. Microbiol.* **144**, 657-660.
- Erz D., Castillo U.F. and Strobel G.A. (2004).** Caronamycins, peptide antibiotics produced by a Verticillate *Streptomyces* sp. (MSU-2110) endophytic *Monstera*. *Microbiol.* **150**, 785-793.
- Evgenia V.T., and Victoria. G. (2004).** Potential for Biodegradation of Hydrocarbons by Microorganisms Isolated from Antarctic Soils. *Z. Naturforsch.* **59**, 140-145.
- Eunice J.A. and Prosser J. I. (1983).** Mycelial growth and branching of *streptomyces coelicolor*. A3 (2) on solid medium. *J. gen. Microbiol.* **129**, 2029-2036.
- Fengel D. and Wegener G. (1989).** In: *Wood: chemistry, ultra structure, reactions*. Ed : De Gruyter W. New York. 613.
- Feist C. J. and G. D. Hegeman. (1969).** Phenol and benzoate metabolism by *Pseudomonas putida*: regulation of tangential pathways. *J. Bacteriol.* **100**, 869-877.
- Fergus C.L. (1964).** Thermophilic and Thermotolerant molds and actinomycetes of mushroom compost during peak heating. *Mycol.* **56**, 267-284.
- Fiss E. and Brooks G.F. (1991).** Use of a siderophore detection Medium, ethylene glycol degradation and B-Galactosidase activity in the early presumptive differentiation of *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Streptomyces* and Rapidly growing *Mycobacterium* species. *J. Clin. Microbiol.* **29**, 1533-1535.
- Flores M., Ford E. G. and Janda J.M. (1990).** Value of the O-Nitrophenyl-D-galactopyranoside test to differentiate among the aerobic actinomycetes *J. Clin. Microbiol.* **28(9)**, 2142-2144.
- Focht D.D. (1997).** Aerobic Biotransformation of Polychlorinated Biphenyls. In *Manual of Environm Microbiol.* Eds : Hurst, C.J., et al. ASM Press.
- Garrity G.M., Bell J.A. and Lilburn T.G. (2004).** Taxonomic Outline of the prokaryotes. In : Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Second Edition. Springer-Verlag. New York.
- Gazenko S.V., Reponen T.A., Grinshpun S.A. and Willeke K. (1998)** Analysis of airborne Actinomycetes spores with fluorogenic substrates. *Appl. Environm. Microbiol.* **64 (11)**, 4410-4415.
- Golovleva. (1980).** Microbial degradation of xenobiotics and recalcitrant compounds. FEMS Symposium N° 12 Leisinger, T. ed., London : Academic Press for the Swiss Academy of Sciences and the Swiss Society of Microbiology on behalf of the Federation of European Microbiological Societies. 415.
- Goerlits D.F, Trouman D.E, Godsy E.M. and Franks B.J. (1985).** Migration of wood-preserving chemicals in contaminated ground water in a sand aquifer at Pensacola Florida. *Environm. Sci. Technol.* **10(19)**, 955-961.
- Gordon R.E. and Smith M.M. (1954).** Proposed group of characters for the separation of *Streptomyces* and *Nocardia*. *J. Bacteriol.* **69**, 147-150.
- Gordon R.E. and Smith M.M. (1953).** Rapidly growing, acid fast bacteria. Species descriptions of *Mycobacterium*. *J. Bacteriol.* **66**, 41-48.

- Gottlieb D. (1973).** General consideration and implication of the actinomycetales. In: Actinomycetales characteristics and practical importance. Eds : G. Sykes and F.A. Skinner. Academic press, London, New York.
- Gottlieb D. (1974).** Actinomycetales. In : Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Eds: R.E. Buchanan et N.E. Gibbons, 8th Ed. The Williams and Wilkins Company, Baltimore. 657-881.
- Grady C.P.L. (1985).** Biodegradation: its measurement and microbiological basis. *Biotechnol. Bioeng.* **27**, 660-674.
- Grafe U., Eritt I., Fleck W.F. (1984).** On the role of A-factor in cytodifferentiation of anthracycline producing strains of *streptomyces griseus*. *Actinom.* **18**, 220-246.
- Gurtler V., Mayall B.C., Seviour R. (2004).** Can whole genome analysis refine the taxonomy of the genus *Rhodococcus*. *FEMS. Microbiol. Rev.* **28**, 377-403.
- Guiraud J. P. (1998).** Techniques d'analyses microbiologiques. In: Microbiologie alimentaire. Dunod, paris. 168-333.
- Hägglom MM., Nohynek L. J., Salkinoja-Salonen MS. (1988).** Degradation and O-methylation of chlorinated phenolic compounds by *Rhodococcus* and *Mycobacterium* strains. *Appl. Environm. Microbiol.* **54**, 3043-3052.
- Hagedorn C. (1976).** Influences of soil activity on *Streptomyces* populations inhabiting forest soils. *Appl. Environm. Microbiol.* **32(3)**, 368-375.
- Hale Boothe D.D., Smith M.C., Gattie D.K. and Das K.C. (2001).** Characterization of microbial populations in landfill leachate and bulk samples during aerobic bioreduction. *Adv. Environm. Research.* **5**, 285-294.
- Hamid L. E., Maldonado L., Eldin G.S.S. Mohamed M.F., Saeed N.G. and Goodfellow M. (2001).** *Nocardia Africana* sp. nov. a new pathogen isolated from patient with pulmonary infections. *J. Clin. Microbiol.* **39**, 625-630.
- Hankin L., Zucker M. and Sands D. C. (1971).** Improved solid medium for the detection and enumeration of pectolytic bacteria. *Appl. Microbiol.* **22**, 205-209.
- Hopper D. J. and Kemp P. D. (1980).** Regulation of enzymes of the 3,5-xyleneol-degradative pathway in *Pseudomonas putida*: evidence for a plasmid. *J. Bacteriol.* **142**, 21-26.
- Horinouchi S. and Beppu T. (1994).** A factor as a microbial hormone that controls cellular differentiation and secondary metabolism in *Streptomyces griseus*. *Molec. Microbiol.* **12**, 859-864.
- Hilali L., Khattabi A., Nssarlah N., Malki A. and Finance C. (2002).** Isolement des nouvelles souches d'actinomycètes productrices de substances antifongiques à partir du milieu naturel marocain. *Biol. Biotech.* **1(2)**, 49-53.
- Hsu S. C. and Lockwood J.L. (1975).** Powdred chitin agar as a selective medium for enumeration of Actinomycetes in water and soil. *Appl. Microbiol.* **29(3)**, 422-426.
- Hunsa P., Mukda K. and Pornthep T. (1999).** Cellulolytic fungi and the bioconversion of fiber from *Agave sisalana*. *Sci. Asia.* **25**, 133-136.

- Jens E., Miguel A. R., Hans-Joachim K. and Doris F. S. (1989).** Bacterial metabolism of 2,6-xyleneol. *Appl and Environm Microbiol, Nouv.* **11(55)**, 2904-2908.
- Joachin W. (2002).** *The Actinomycetales*, An order of the class of Actinobacteria Important. In : the pharmaceutical industry. *Electronic Manual*.
- Jung H.Y., Young G.C., Seok S.K., Seung B.K., Sung T.L. and Yong H.P. (2000).** *Rhodococcus Koreensis* sp., a 2, 4-dinitrophenol degrading bacterium. *Inter. J. Evol. Microbiol.* **50**, 1193-1201.
- Jung Y.L, Byung K.H. (2002).** Diversity of antifungal actinomycetes in various vegetative soils of Korea. *Can. J. Microbiol.* **48**, 407-417.
- Isik K., Chun J., Hah Y.C. and Goodfellow M. (1999).** *Nocardia Salmocida*: a fish pathogen. *Inter. J. Syst. Bacteriol.* **49**, 833-837.
- Kanaly RA, Harayama S. (2000).** Biodegradation of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by bacteria. *J. Bacteriol.* **182**, 2059–2067.
- Kim D.W., Kim Y.S., Kim S.K., Kim S.W., Zylstra G.J., Kim Y.M. and Kim E. (2002).** Monocyclic Aromatic Hydrocarbon Degradation by *Rhodococcus* sp. Strain DK17 *Appl. Environm. Microbiol.* **68**, 3270-3278.
- Kim D.W., Chater K., Lee K.J. and Hesketh D. (2005).** Changes in the extracellular proteome caused by the absence of the *bldA* gene product, a developmentally significant tRNA, reveal a new target for the pleiotropic regulator AdpA in *Streptomyces coelicolor*. *J. Bacteriol.* **187(9)**, 2957-2966.
- Kimura N. and Urushigawa Y. (2001).** Metabolism of dibenzo-p-dioxin and chlorinated dibenzo-p-dioxin by a gram-positive bacterium, *Rhodococcus opacus* SAO 101. *J. Biosci. Bioeng.* **92**, 138-143.
- Klemm D., Schmauder HP., Heinze T. (2002).** Cellulose. In : Biopolymers. Polysaccharides II. Eds : Vandamme EJ., De Baets S., Steinbüchel A. Weinheim Germany, Wiley-VCH. **6**, 275–319.
- Khokhlov A.S. (1986).** Actinomycete autoregulators. In : Biological, biochemical and biomedical aspects of actinomycetes. Eds : G. Szabo S. Biro M. Goodfellow. Akademiai kiado, Budapest. 791-798.
- Kitagawa W., Suzuki A., Hoaki T., Masai E. and Fukuda M. (2001).** Multiplicity of aromatic ring hydroxylation dioxygenase genes in a strong PCB degrader, *Rhodococcus* sp. strain RHA1 demonstrated by denaturing gradient gel electrophoresis. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **65**, 1907-1911.
- Kirk O., Dmhus T., Borchert TV., Fuglsang CC. (2005).** Enzyme applications industrial in: seldel A(Ed)-Kirk-Othmer. encyclopedia of chemical technology. 5th edition, *New-York. Wilet-Interscience.* **248(10)**, 317-898.
- Konig C., Eulberg D., Groning J., Lakner S., Seibert V., Kaschabek SR. and Schlomann M. (2004).** A linear megaplasmid, p1CP, carrying the genes for chlorocatechol catabolism of *Rhodococcus opacus* 1CP. *Microbiol.* **150**, 3075-87.

- Kuhad R.C., Singh A. and Eriksson K.E. (1997).** Microorganisms and enzymes involved in the degradation of plant fiber cell walls. In : *Advances in Biochemical Engineering Biotechnology*. Ed : Eriksson K.E. Springer-Verlag, Germany.
- Lacey J. (1973).** Actinomycetes in soils, composts and fodders. In: *Actinomycetales: characteristics and practical importance*. Eds.: G. Sykes, F.A. Skinner. Academic press, London, New York. 231-251.
- Lacey J. (1997).** Actinomycetes in composts. *Ann. Agr. Env. Med.* **4**, 113-121.
- Larkin M.J., Kulakov L.A. and Allen C.C. (2005).** Biodegradation and *Rhodococcus* masters of catabolic versatility. *Curr. Opin. Biotechnol.* **16**, 282-290.
- Larpent J.P. et Sanglier J.J. (1989).** *Biotechnologie des antibiotiques*. Ed. Masson. Paris, 481.
- Larpent J.P. et Larpent-Gourgau M. (1985b).** *Manuel pratique de microbiologie*. Hermann. Paris. 157-162.
- Lebrecque M.H. (2003).** Etude de la capacité de deux souches de levures à dégrader le xylène. Faculté des Sciences de l'agriculture et de l'alimentation. Université de Laval.
- Lechevalier H.A., and Lechevalier M.P. (1967).** Biologie of actinomycetes. *Ann. Rev. Microbiol.* **21**, 71-100.
- Lechevalier M.P., Bievre C.D. and Lechevalier H. (1977).** Chemotaxonomie of aerobic Actinomycetes : phospholipides composition. *Bioch. Syst. Ecol.* **5**, 249-260.
- Lechevalier M.P., Lechevalier H.A. (1980).** The chemotaxonomy of actinomycetes. In: *microbiology thayer, Actinomycete taxonomy*. Eds : A. DIETZ, D.W.. Society for industrial SIM special publication number 6. Arlington, Virginia USA. 225-291.
- Lechevalier H.A. and Lechevalier M.P. (1981).** Introduction to the order Actinomycetales. In: *The procaryotes*, Eds : Starr M. P., H. Stolp, H. G. Truper, A. Ballows and H. G. Schlegel. Springer-Verlag. Berlin. **2**, 1915-1922.
- Lechevalier M.P. and Lechevalier H. (1985).** "Biology of actinomycetes not belonging to genus *Streptomyces* In: *Biology of industrial microorganisms*. The Benjamin Cummings Publishing Company, INC. 315-360.
- Lekchiri S., Moueqqit M. and Lekchiri A. (2006).** Mise en évidence d'une activité cellulase chez *Fusarium oxysporum f.sp albedinis* induite par une nouvelle forme d'hydrocellulose purifiée. Congrès International de Biochimie. Agadir.
- Leveau J.Y. et Buix M. (1993).** Les Actinomycètes. In : *Les microorganismes d'intérêt industriel*. Ed : Florent J. Edition Tec et Doc. Lavoisier Apria. 424-480.
- Li J Chen J.A., Zhao Q., Li X. and Shu W. (2006).** Bioremediation of environmental endocrine disruptor di-n-butyl phthalate ester by *Rhodococcus ruber*. *Chemosphere.* **65**, 1627-33.
- Lin T.C., Young C.C., Ho M.J., Yeh M.S., Chou C.L., Wei YH. and Chang JS. (2005).** Characterization of floating activity of indigenous diesel-assimilating bacterial isolates. *J. Biosci. Bioengin.* **99**, 466-472.

- Linus A., Berekaa M.M., Steinbüchel A., Kim K.K., Spröer C. and Kroppenstedt R.M. (2002).** *Gordonia westfalica* sp. nov., a novel rubber-degrading actinomycete. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **52**, 1133-1139.
- Linus A., Steinbuchel A., Sproer C. and Kroppenstedt R.M. (1999).** *Gordonia polyisoprenivorans* sp. nov., a rubber-degrading actinomycete isolated from an automobile tyre. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **49**, 1785-1791.
- Locci R. (1989).** Streptomycetes and related genera. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Eds: S.T. Williams, M.E. Sharpe et J.G. Holt.. The Williams and Wilkins Company, Baltimore. **4**, 2451-2508
- Lopes A., Coelho R.R., Meirelles M. N. I., Branquinha M. H. and Vermelho A. B. (1999).** Extracellular serine-proteinases isolated from *Streptomyces alboniger*. Partial characterization and effect of aprotinin on cellular structure. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.* **94**, 763-770.
- Makawi A.A.M. (1980).** The effect of thermophilic actinomycetes isolated from compost and animal, manure on some strains of salmonelle and shigella. *Zentralbl. Bakteriologie.* **135**, 12-21.
- Manfe C. (1993).** Approche Mycologique de la Bioepuration des Lixiviats de décharges de Classe I. Thèse de Doctorat. INSA.
- Margalith P.Z. (1992).** Pigment microbiology. Shapman and Hall. London. 5-114.
- Mariat F. et Sebald M. (1990).** Les actinomycètes. In: Bactériologie médicale. Le Minor. Edition Médecine-Science. Flammarion. France. 935-949.
- Mason M.G., Ishizawa K., Silkstone G., Nicholls P. and Wilson M.T. (2001).** Extracellular heme peroxidases in Actinomycetes: A case of Mistaken identity. *Appl. Environm. Microbiol.* **67(10)**, 4512-4519.
- McCarthy A.J. et Williams S.T. (1992).** Actinomycetes as agents of biodegradation. *Environm. review.* **115 (1-2)**, 189-192.
- McNeil M.M, Brwn J.M. , Jaris W.R. and Ajelo L. (1990).** Comparison of species distribution and antimicrobial susceptibility of aerobic actinomycetes from clinical specimens. *Rev. Infect. Dis.* **12**, 778-783.
- Michel C. et Thierry E. (1994).** Isolement des streptomycètes du sol. *L'opéron.* **19**, 13-17.
- Moody J.D., Freeman J.P., Doerge D.R. and Cerniglia C.E. (2001).** Degradation of phenanthrene and anthracene by cell suspension of *Mycobacterium sp.* Strain PYR-1. *Appl. Environm. Microbiol.* **67(4)**, 1476-1483.
- Mocheva P., Tishkov S., Dimitrova N., Chipeva V., Antonova-Nikolova S. and Bogatzevska N. (2002).** Characteristics of actinomycetes from Antarctica. *J. Cult. Collect.* **3**, 3-14.
- Mrozik A., Piotrowska-Seget Z. and Labuzek S. (2003).** Bacterial degradation and bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Pol. J. Environm. Stud.* **12**, 15-25.
- Mishra S.K., Gordon R.E. and Barnett D.A. (1980).** Identification of *Nocardia* and *Streptomyces* of medical importance. *J. Clin. Microbiol.* **11(6)**, 728-736.

- Mustin M. (1987).** Le Compost, gestion de la matière organique. Ed : François Dubusc. Paris, 954.
- Mutnuri S., Vasudevan N. and Kaestner M. (2005).** Degradation of anthracene and pyrene supplied by microcrystals and non-aqueous-phase liquids. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **67**, 569-576.
- Myadogh S., Tsuchizaki N., Ishikawa J. and Hotta K. (2002).** Digital Atlas of Actinomycetes. (<http://www.nih.go.jp/saj/DigitalAtlas>). The Society of Actinomycetes. Tokyo, Japan.
- Nalli S., Cooper D.G. and Nicell J.A. (2002).** Biodegradation of plasticizers by *Rhodococcus rhodochrous*. *Biodegrad.* **13**, 343-352.
- Navarro-Llorens J.M., Patrauchan M.A., Stewart G.R., Davies J.E., Eltis L.D. and Mohn W.W. (2005).** Phenylacetate catabolism in *Rhodococcus* sp. strain RHA1: a central pathway for degradation of aromatic compounds. *J. Bacteriol.* **187**, 4498-4504.
- Nicemol Jacob K.N., Niladevi G.S. and Anisha, P. (2006).** Hydrolysis of pectin: An enzymatic approach and its application in banana fiber processing. *Microbiological Research*, (article in press)
- Niemi G.J. and Veith G.D. (1989).** An Approach for Development of Structure-Biodegradation Relationships of Organic Chemicals. *Aquat. Toxicol. Environm. Fate.* **11**, 459-467.
- Nishino S.F. and Spain J.C. (1997).** Biodegradation and Transformation of Nitroaromatic Compounds. In : Manual of Environmental Microbiology. Eds : Hurst, C.J. et al. ASM Press.
- Nodwell J.R. and Losick R. (1998).** Purification of an extracellular signalling molecule involved in production of aerial mycelium by *Streptomyces coelicolor*. *J. Bacteriol.* **180(5)**, 1334-1337.
- Odier E. and Roua X. (1985).** Les cellulases et les enzymes de dépolymérisation de la lignine. In: Hydrolases et dépolymérases. Eds : Mouranche A. and Costes C., Paris, Gauthier-Villars. 199-238.
- Ouhdouch Y., Barakate M. and Finance C. (2001).** Actinomycetes of maroccan habitats: isolation and screening for antifungal activities. *Eur. J. Biol.* **37**, 69-74.
- Olson E.H. (1968).** Actinomycetes isolation Agar. In : Difco Supplementary Literature. Difco Lab. Detroit, Michigan.
- Oulmi L. (2004).** Identification des *actinomycétales* isolées des eaux et de sol de sebkha. Optimisation des milieux de culture de sporulation et de croissance. Thèse de Magister. Faculté des Sciences. Université Mentouri Constantine.
- Omura S. (1992).** The search for bioactive compounds from microorganisms. Springer Verlag, New York. Inc.281-303.
- Omura S., Ikeda H., Ishikawa J. Hanamoto A., Takahashi C., Shinose M., Takahashi Y., Horikawa H., Nakazawa H. and Osonoe T. (2001).** Genome sequence of an industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*: deducing the ability of producing secondary metabolites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **98**, 12215-12220.
- Onsori H., Zamani R.M., Motallebi M. and Zarghami N. (2004).** Identification of over producer strain of endo *B-1-4*-glucanase in *Aspergillus* Species : Characterization of crude carboxymethyl cellulose. *Biotechnol.* **4(1)**, 26-30.

- Oskay M., Tamer A. U. and Azeri C. (2004).** Antibacterial activity of some actinomycetes isolated from farming soils of Turkey. *Afric. J. Biotechnol.* **3(9)**, 441-446.
- Ottow J. C.G. and Glathe H. (1968).** Rose Bengal-malt extract-agar, a simple medium for the simultaneous isolation and enumeration of fungi and actinomycetes from soil. *Appl. Microbiol.* **16**, 170-171.
- Ouled daoud F., Amrani F. et Saadoun T. (2005).** Valorisation et traitement des déchets cellulosiques par la dégradation enzymatique par la cellulase *Aspergillus nige*. Premier séminaire international sur l'environnement et ses problèmes connexes.
- Pagga U. (1997).** Testing Biodegradability with Standardized Methods. *Chemos.* **35**, 2953-2972.
- Patrauchan M.A., Florizone C., Dosanjh M., Mohn W.W., Davies J. and Eltis LD. (2005).** Catabolism of benzoate and phthalate in *Rhodococcus* sp. strain RHA1: redundancies and convergence. *J. Bacteriol.* **187**, 4050-4063.
- Pelmont J. (1993).** Bactéries et environnement - Adaptations physiologiques. *Presses Universitaire de Grenoble.* 899.
- Pérez S., Mazeau K. and Hervé du Penhoat C. (2000).** The three-dimensional structures of the pectic polysaccharides, *Plant Physiol. Biochem.* **38**, 37-55.
- Perry J.J., Staley J.T. and Lory S. (2004).** Microbiologie, cours et questions de révision. Dunod. Paris. 497-850.
- Petrosyan P., Gacia-varela M., Madrigal A., Huitron C. and Flores M.E. (2003).** *Streptomyces mexicanus* sp. nov., a xylanolytic microorganism isolated from soil. *Inter. J. Syst. Evol. Microbiol.* **53**, 269-273.
- Pochon J. et Tardieux P. (1962).** Techniques d'analyses en microbiologie du sol. Edition de la tourtourelle, Saint Mandé. 110-111.
- Porter J.N., Wilhem J.J. and Tresner H.D. (1960).** Method for the preferential isolation of actinomycetes from soil. *Appl. Microbiol.* **8**, 174.
- Porter J.N. (1971).** Prevalance and distribution of antibiotic producing actinomycetes. *Adv. Appl. Microbiol.* **14**, 73-92.
- Pridham T.G., Gottlieb D. (1948).** The utilization of carbon compounds by some actinomycetales as an aid for species determination. *J. Bacteriol.* **56**, 107-114.
- Ralet M.C., Bonnin E. and Thibault J.F. (2002).** Pectins. In: Biopolymers. Polysaccharides II. Eds : Vandamme E.J., De Baets S., Steinbüchel A. Weinheim, Germany: Wiley-VCH.
- Rapp P., Gabriel-Jurgens L.H.E. (2003).** Degradation of alkanes and highly chlorinated benzenes, and production of biosurfactants, by a psychrophilic *Rhodococcus* sp. and genetic characterization of its chlorobenzene dioxygenase. *Microbiol.* **149**, 2879-2890.
- Ravel J., Amoroso M.J., Colwell R.R. and Hill R.T. (1998).** Mercury –resistant actinomycetes from Chesapeake Bay. *FEMS. Microbiol. Lett.* **162**, 177-184.

- Reh fuss M., Urban J. (2005).** *Rhodococcus phenolicus* sp. nov., a novel bioprocessor isolated actinomycete with the ability to degrade chlorobenzene, dichlorobenzene and phenol as sole carbon sources. *Syst. Appl. Microbiol.* **28**, 695-701.
- Reponen T.A., Gazenko S.V., Grinshpun S.A., Willeke K. and Cole E.C. (1998).** Characteristics of airborne actinomycetes spores. *Appl. Environm. Microbiol.* **64**, 3807-3812.
- Rivas R., Sanchez M., Trujillo M. E., Zurdo-pineiro J.L., Mateos P.F., Martinez-Molina E. and Velazquez E. (2003).** *Xylanimonas cellulosityca* gen. Nov., sp. Nov., a xylanolytic bacterium isolated from a decayed tree (*Ulmus nigra*). *Inter. J. Syst. Evol. Microbiol.* **53**, 99-103.
- Rose K. and Steinbuchel A. (2005).** Biodegradation of natural rubber and related compounds: Recent insights into a hardly understood catabolic capability of microorganisms. *Appl. Environm. Microbiol.* **71**, 2803-2812.
- Rousseaux S. (2001).** Diversité taxonomique, génotypique et physiologique des souches bactériennes dégradant l'atrazine dans les sols. Thèse de l'Université de Bourgogne, UFR des Sciences de la Terre.
- Rouau X. and Thibault J.F. (1987)** Les Fibres Alimentaires. Paris: APRIA.
- Rodionova N.A., Kaprel-yants L.V., Serednitskii P.V. and Kilimnik A.Y. (1992).** Hemicelluloses of cereal grains and their enzyme catalysts. *Appl. Bioch. Microbiol.* **28 (5)**, 485-501.
- Rutot D. and Dubois P. (2004).** Les (bio) polymères Biodégradables : l'enjeu de demain. *Chim. Nouv.* **86**, 66-75.
- Sanglier J.J., Wellington E.M.H., Kamoun A., Kelly C., Mercer D.K., Prinzis S. and Trigo C. (1993).** Novel bioactive compounds from Actinomycetes. *Res. Microbiol.* **144**,661-663.
- Sanglier J.J. et Trujillo M. (1997).** Substances bioactives produites par les actinomycetes et stratégie de sélection de souches. *Bull. Soc. Fr. Microbiol.* **12**, 13.
- Société d'Ecotoxicologie Fondamentale et Appliquée. (1990).** Evaluation de la dégradation des Substances Organiques dans l'Environnement. Rapport et Communications du Congrès International de Paris. SEFA et Ministère de l'Environnement.
- Schofield G.M. and Schaal K.P. (1981)** A numerical taxonomic study of members of the *Actinomycetaceae* and related taxa. *J. Gen. Microbiol.* **121**, 237-259.
- Shirling E.B. and Gottlieb D. (1966).** Methods for characterisation of *Streptomyces* species. *Intern. J. Syst. Bacteriol.* **16(3)**, 313-340.
- Shirling E.B. and Gottlieb D. (1972).** Cooperative description of type strains of *Streptomyces*. *Intern. J. Syst.* **22**, 265-394.
- Shirling E.B. and Gottlieb D. (1976).** Retrospective evaluation of International Streptomyces Project taxonomy criteria, in: Actinomycetes the boundary microorganisms. Ed : Arai T. Tokyo. 9-42.

- Singh D. (1999).** Antibacterial activity of actinomycetes isolated from various geographical regions of Nepal and characterization of their antibacterial agents. A MSc thesis submitted to the central Department of Microbiology. Tribhuvan University.
- Song j., Weon H.Y., Yoon S.H., Parrk D.S., Go S.J. and Suh J.W. (2001).** Phylogenetic diversity of thermophilic Actinomycetes and *Thermoactinomycetes* isolated from mushroom composts in Korea based on 16S rRNA gene sequence analysis. *FEMS. Microbiol. Lett.* **202**, 97-102.
- Sprusansky O., Zhou L., Jordan S., White J. and Wespheling J. (2003).** Identification of new genes involved in morphogenesis and antibiotic production in *Streptomyces coelicolor*. *J. Bacteriol.* **185(20)**, 6147-6157.
- Stackebrandt E. Rainey F.A. and Ward-Rainey N.L. (1997).** Proposal for a new hierarchic classification system, *Actinobacteria* classis nov. *j. Syst. Bacteriol.* **47**, 479-491.
- Staneck J.L. and Roberts G.D. (1974).** Simplified approach to identification of aerobic Actinomycetes by thin-layer chromatography. *Appl. Microbiol.* **28(2)**, 226-231.
- Stingley R.L., Brenza B., Khan A.A. and Cerniglia C.E.N. (2004).** Novel organization of genes in a phthalate degradation operon of *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1. *Microbiol.* **150**, 3749-3761.
- Stutzenberger F. J. (1987).** Inducible thermoalkalophilic polygalacturonate lyase from *Thermomonospora fusca*. *J. Bacteriol.* **169**, 2774-2780.
- Suutari M., Lignell U., Hyvarinen A. and Nevalainen A. (2002).** Media for cultivation of indoor streptomycetes. *J. Microbiol. Meth.* 1668-1674.
- Suzuki S.I., Okuda T. and Komatsubara S. (1999).** Selective isolation and distribution of *Sporichthya* strains in soil. *Appl. Env. Microbiol.* **65(5)**, 1930-1935.
- Suzuki S.I. (2001).** Establishment and use of gellan gum media for selective isolation and survey of specific rare Actinomycetes. *Actinomy.* **15(2)**, 55-60.
- Takizawa M., Cowell R.R. and Hill R.T. (1993).** Isolation and diversity of Actinomycetes in the Chesapeake Bay. *Appl. Environm. Microbiol.* **144**, 647-651.
- Thompson C.J., Fink D. and Nguyen L.D. (2002).** Principles of microbial alchemy: insights from the *Streptomyces coelicolor* genome sequence. *Gen. Biol.* **3(7)**, 10201-10204.
- Tay S.T.L., Hemond F.H., Krumholz L.R., Cavanaugh C.M. and Polz M.F. (2001).** Population dynamics of two toluene degrading bacterial species in a contaminated stream. *Microbiol. Ecol.* **41**, 124-131.
- Tibbles B.J., Alexander A. and Baecker W. (1989).** Effect of pH and inoculum size on phenol degradation by bacteria isolated from landfill waste. *Environm. Pollut.* **59**, 227-239.
- Tsitko I. (2007).** Characterization of *Actinobacteria* Degrading and Tolerating Organic Pollutants. Division of Microbiology Department of Applied Chemistry and Microbiology. Faculty of Agriculture and Forestry. University of Helsinki.
- Uz I., Duan Y.P. and Ogram A. (2000).** Characterization of the naphthalene-degrading bacterium, *Rhodococcus opacus* M213. *FEMS. Microbiol. Lett.* **185**, 231-

- Van der Geize R. and Dijkhuizen L. (2004).** Harnessing the catabolic diversity of rhodococci for environmental and biotechnological applications. *Curr. Opin. Microbiol.* **7**, 255-261.
- Van der zee M., sistma L., Tournois H. and De wit D. (1994).** Assessment of the biodegradation of water insoluble polymeric materials on aerobic and anaerobic aquatic environments, *Chemosphere.* **28**, 1757-1771.
- Vitalis S., Vallu G., Bekesi I., Szeszak F. and Szabo G. (1986).** Effect of factor C on the differentiation of *sreptomycetes griseus*. In: Biological, Biochemical and Biomedical Aspects of Actinomycetes. Eds : G.Szabo, S. Biro, M. Goodfellow. Akademiai kiad, Budapest. 799-806.
- Waksman S.A. (1939b).** Thermophilic actinomycetes and fungi in soils and in composts soil. *Sci.* **47**, 37-61.
- Waksman S.A. (1950).** The Actinomycetes : their nature, occurrence, activities, and importance. Chronic. Botan. Company, Waltham, MA, USA.
- Waksman S.A. (1959).** The actinomycetes : nature, occurrence and activities, Williams and Wilkins. Company, Baltimore. **1**, 29-46.
- Weyland H. (1981).** Distribution of actinomycetes on the sea floor. In: Actinomycetes. Eds : K. Schaal, G. Pulverer. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York. *Zbl. Bakt. Suppl.* **11**, 185-193.
- Westerberg K., Elvang A.M., Stackebrandt E. and Jansson J.K. (2000).** *Arthrobacter chlorophenolicus* sp. Nov., a new species capable of degrading high concentrations of 4-chlorophenol. *Inter. J. Syst. Evol. Microbiol.* **50**, 2083-2092.
- Williams S.T. and Davies F.L. (1965).** Use of antibiotics for selective isolation and enumeration of actinomycetes in soil. *J. Gen. Microbiol.* **38**, 251-261.
- Williams S.T. and Wellington E.M.H. (1982).** Principales and problems of selective isolation of microbes. In: Bioactive microbial products: Search and discovery. Academic Press, London. 9-26.
- Williams S.T., Lanning S. and Wellington E.M.H. (1984).** Ecology of Actinomycetes. In: The Biology of the Actinomycetes. Eds : M. Goodfellow, M. Mordarski et S.T. Williams. Academic press, London, New York, Sydney, Tokyo, Sao Paulo. 481-528.
- Williams S. T., Locci R., Beswick A., Kurtboke D. I., Kuznetsov V. D., Le Monnier F. J., Long P. F., Maycroft K. A., palma R. A., Petrolini B., Quaroni S., Todd J.I. and West.M. (1993).** Detection and identification of novel actinomycetes. *Microbiol.* **144**, 653-656.
- Wink J.M., Kroppenstedt R.M., Ganguli B.N., Nadkarni S.R., Shumann P., Seibert G. and Stackebrandt E. (2003).** Three new antibiotic producing speicies of the genus *Amycolatopsis*, *Amycolatopsis balhimycina* sp.Nov., *Tolypomycina* sp. Nov. *Vancoresmycina* sp. Nov. and *Amycolatopsis Keratiniphina* sub sp. *Nogabecina* sub sp. Nov. *Syst. Appl. Microbiol.* **26**, 38-46.
- Xiu-LI W., Yang K. and Wang YZ. (2003).** Properties of Starch blends with biodegradable Polymers. *J. Macro mol. Sci. Part C – Polymer Reviews.* **43 (3)**, 385–409.
- Zaitlin B., Watson S.b., Ridal J., Satchwill T. and Parkinson D. (2003).** Actinomycetes in lake Ontario: Habitats and geosmin and MIB production. *Res. J. Can.* **95 (2)**, 113-118.

Zaitsev G.M., Tsitko I.V., Lobanok A.G., Vazhinskaja I.S. and Chechenin V.P. (1993). Utilization of halogenated benzenes by *Rhodococcus rhodochrous*. *Dokl. Akad. Nauk Beloruss. SSR.* **37**, 65–68.

Zerizer H. (2004). Identification des *Actinomycetales* isolés de sols arides. Optimisation des milieux de croissance et de sporulation. Thèse de Magistère. Faculté des Sciences. Université Mentouri Constantine.

Annexes

Annexe1

Milieux de culture

Amidon-Caséine

Amidon soluble	10 g
Caséine	1 g
K ₂ HPO ₄	0,5 g
Eau distillée	1000 ml
Agar	20 g

pH = 7-7,5

Milieu Olson

Sodium caséinate	2 g
L-Asparagine	0,1 g
Sodium propionate	4 g
K ₂ HPO ₄	0,5 g
FeSO ₄	0,01 g
Eau distillée	1000 ml
Agar	20 g

pH = 7

Pectine Agar

Pectine	5 g
Extrait de levure	5 g
Eau distillée	1000 ml
Agar	20 g

pH = 7,0

Mannitol-Mobilité (Guiraud, 1998)

Peptone	20 g
Nitrate de potassium	1 g
Mannitol	2 g
Rouge de phénol	40m g
Eau distillée	1000 ml
Agar	4 g

pH = 8,1

ISP 2

Extrait de levure	4 g
Extrait de malt	10 g
Glucose	4 g
Eau distillée	1000 ml
Agar	20 g

pH = 7,3

ISP 3

Solution d'avoine	1000ml (Annexe2)
Solution d'oligo-éléments	1ml (Annexe2)
Agar	20g

pH = 7,2

ISP 4

Amidon soluble	10 g
K ₂ HPO ₄	1 g
MgSO ₄ 7H ₂ O	1 g
NaCl	1 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	2 g
CaCO ₃	2 g
Solution d'oligo-éléments	1 ml (Annexe2)
Eau distillée	1000 ml
Agar	20 g

pH = 7,0-7,4

ISP 5

Glycérol	10 g
L-Asparagine	1 g
Solution d'oligo-éléments	1 ml (Annexe2)
Eau distillée	1000 ml
Agar	20 g

pH = 7,0-7,4

ISP 6

Peptone	15 g
---------	------

Proteose-Peptone	5 g
Citrate de fer ammoniacal	0,5 g
Thiosulfate de sodium	0,08 g
Extrait de levure	1 g
K ₂ HPO ₄	1 g
Eau distillée	1000 ml
Agar	20 g

pH = 7,0-7,2

ISP 7

Glycérol	15 g
L-Tyrosine	0,5 g
L-Asparagine	1 g
K ₂ HPO ₄	0,5 g
MgSO ₄ 7H ₂ O	0,8 g
NaCl	0,5 g
FeSO ₄ 7H ₂ O	0,01 g
Solution d'oligo-éléments	1 ml (Annexe2)
Eau distillée	1000 ml
Agar	20 g

pH = 7,2-7,4

ISP₉

(NH ₄) ₂ SO ₄	2,64 g
KH ₂ PO ₄	2,38 g
K ₂ HPO ₄ 3H ₂ O	5,65 g
MgSO ₄ 2H ₂ O	1 g
Solution saline	1 ml (Annexe2)
Eau distillée	1000 ml
Agar	20 g

pH = 6,8-7,0

Milieu minimum (Alexander and Lustigman, 1966)

K ₂ HPO ₄	2,1 g
KH ₂ PO ₄	0,4 g
NH ₄ NO ₃	0,5 g
MgSO ₄ 7H ₂ O	0,2 g

CaCl ₂ 2H ₂ O	0,023 g
FeCl ₃ 6H ₂ O	0,002 g
Eau distillée	1000 ml
Agar	20 g

pH = 7,0

N.B : 0,2g/l du 2,5-xylénol ou du 2,6-xylénol est utilisé comme unique source de carbone et d'énergie.

Sporulation agar

Extrait de levure	1 g
Extrait de viande	1 g
Tryptose	2 g
FeSO ₄ 7H ₂ O	Traces
Glucose	10 g
Eau distillée	1000 ml
Agar	20 g

pH = 7,2

CYD

Casamino acids	0,5 g
Extrait de levure	0,3 g
D-Glucose	0,4 g
K ₂ HPO ₄	2 g
Eau distillée	1000ml
Agar	20 g

pH = 7,2

Gélose viande foie

Extrait de viande	10 g
Peptone	20 g
Extrait de levure	10 g
Glucose	5 g
Eau distillée	1000 ml
Agar	20 g

pH = 7,6

Bouillon nutritif

Peptone	10 g
Extrait de levure	5 g
NaCl	5 g
Eau distillée	1000 ml

pH = 7,2

Glycérol-extrait de sol (GSEA)

Peptone	5 g
Extrait de viande	3 g
Glycérol	20 g
Extrait de sol	150 ml (Annexe2)
Eau distillée	1000 ml
Agar	20 g

pH = 7

Gélose au cerveau et au cœur de veau

Protéose peptone	10 g
Infusion de cerveau de veau	12,5 g
Infusion de cœur de boeuf	5 g
NaCl	5 g
Phosphate disodique	2,5 g
Glucose	2 g
Eau distillée	1000 ml
Agar	20 g

pH = 7,4

Bennett (liquide)

Glucose	10 g
Extrait de levure	1 g
NZ amine (caséine digest)	2 g
Extrait de viande de boeuf	1 g
Eau distillée	1000 ml

pH = 7,3

Muller Hinton

Extrait de viande	2 g
Hydrolysate acide de caséine	17,5 g
Amidon	1,5 g
Eau distillée	1000 ml
Agar	10 g

pH = 7,4

Annexe2

Solutions et colorants

Solution d'oligo-éléments

FeSO ₄ 7H ₂ O	0,1 g
MnCl ₂ 4H ₂ O	0,1 g
ZnSO ₄ 7H ₂ O	0,1 g
Eau distillée	100 ml

Solution saline

CuSO ₄ 5H ₂ O	0,64 g
FeSO ₄ 7H ₂ O	0,11 g
MnCl ₂ 4H ₂ O	0,79 g
ZnSO ₄ 7H ₂ O	0,15 g
Eau distillée	100 ml

Solution d'avoine

Grains d'avoine	20 g
Eau distillée	1000 ml

*Faire bouillir pendant 20 minutes, filtrer sur gaze et réajuster le volume à 1000ml.

Extrait de sol

Sol du jardin séché et tamisé	49 g
Eau de robinet	960 ml

*Stérilisation à 121°C pendant 1 heure

Après refroidissement le surnageant décanté est filtré, puis stériliser à 121°C pendant 20 minutes et conservé à température ambiante.

Carbolfuch sine de ziehl (solution A)

Fuch sine basique	3 g
Alcool éthylique à 95%	jusqu'à 100 ml

* Colorant à filtrer avant utilisation

Solution aqueuse de phénol (solution B)

Phénol	5 g
Eau distillée	jusqu'à 90 ml

* le phénol est liquéfié dans un flacon par un chauffage léger au bain marie.

Fuchsine phéniquée de ziehl

Solution A	10 ml
Solution B	90 ml

Solution de contre coloration du bleu de méthylène

Bleu de méthylène	0,3 g
Eau distillée	jusqu'à 100 ml

Décolorant de Ziehl-Neelson

Bleu de méthylène	10 g
Alcool éthylique absolu	300 ml
Acide sulfurique à 60°	200 ml
Eau distillée	500 ml

Décolorant de la coloration de Ziehl-Neelson modifiée

HCl concentré à 35%	3 ml
Alcool éthylique à 95%	97 ml

Abstract

Two agricultural soils (Ain el-karma and Sissaoui) and two forest soils (DJebel-El- Ouahch and Chaab- Errssas) were used in this study. Thus, thirty-nine actinomycetes colonies were taken from two selective media for actinomycetes (Starch-Caseine and Olson) added antibiotics and seeded by these soil samples. The strains have been purified in the same media that have been used for isolation.

The isolated and purified strains are tested for their ability to degrade some natural organic compounds (cellulose and pectic substances) or xénobiotics (2.5-Xylenol and 2.6-Xylenol). Of the thirty-nine strains purified, eighteen strains are active in at least one substrates studied. One strain metabolizes the four substrates studied.

Among active strains, twelve are cellulolytics, thirteen are pectinolytics, seven and eleven use, respectively, the 2.5-Xylenol and 2.6-Xylenol as the sole source of carbon and energy. Four and six strains using toxic compounds tolerate, respectively, high concentrations of 2.5-xylenol and 2.6-xylenol up to 3000mg /l in the culture medium.

On the bases of morphological, physiological and biochemical characters as well as cellular colorations, ten of the active strains allowed bringing *Streptomyces* genus, three *Mycobacterium* genus, two *Micromonospora* genus, one *Nocardia* genus, one *Rhodococcus* genus and one *Cellulomonas* genus.

Key words: Actinomycetes, biodegradation, natural organic compounds, cellulose, pectic substances, xenobiotics, 2,5-Xylenol, 2,6-Xylenol.

من أربعة عينات من التربة ، اثنان منها تربة زراعية (عين الكرمة و سيساوي) و اثنان غابية (جبل الوحش و شعاب الرصاص) تم عزل و انتقاء تسع و ثلاثين سلالة من البكتيريا الخيطية أكتينومييسات على وسطين غذائيتين مكملين بالمضادات (Amidon-Caséine و Olson) الحيوية.

السلالات المعزولة تم اختبار قدرتها على تحليل و استعمال بعض المواد العضوية الطبيعية (السيليلوز و المواد البكتينية) أو الغير طبيعية (2.5-كزيلينول و 2.6-كزيلينول) كمصدر وحيد للكربون و الطاقة. من ضمن السلالات المعزولة، ثمانية عشر سلالة قادرة على تحليل مادة على الأقل من ضمن المواد المدروسة.

اثني عشرة منها قادرين على تحليل السيليلوز، ثلاثة عشر قادرين على تحليل البكتين، سبعة يستعملون 2.5-كزيلينول كمصدر وحيد للكربون و الطاقة من بينهم أربعة لهم القدرة على النمو في وجود تراكيز عالية من هذا الأخير(3000 مغ / لتر) و احدي عشر يستعملون 2.6-كزيلينول كمصدر وحيد للكربون و الطاقة من بينهم ستة لهم القدرة على النمو في وجود تراكيز عالية من هذا الأخير(3000 مغ / لتر).

، الدراسات المورفولوجية، الفيزيولوجية و البيوكيميائية و كذلك التلوينات الخلوية التي أجريت للسلالات الفعالة مكنتنا من تصنيف عشرة منها في جنس *Streptomyces* ، ثلاثة في جنس *Mycobacterium* اثنان في جنس *Micromonospora* ، واحدة في جنس *Nocardia* ، واحدة في جنس *Rhodococcus* و واحدة في جنس *Cellulomonas*.

الكلمات الدالة:

أكتينومييسات، التحليل الحيوي، مواد عضوية طبيعية، سيليلوز، مواد بكتينية، مواد عضوية غير طبيعية، 2.5-كزيلينول، 2.6-كزيلينول.

Résumé

Deux sols agricoles (Ain-El-karma et Sissaoui) et deux sols forestiers (Djebel-El-Ouahch et Chaab-Errssas) ont été utilisés dans cette étude. Ainsi, trente neuf colonies actinomycétales ont été prélevées à partir de deux milieux sélectifs pour actinomycètes (Amidon-Caseine et Olson) additionnés d'antibiotiques et ensemencés par ces échantillons de sols. Les souches ont été purifiées sur les mêmes milieux qui ont servi pour l'isolement.

Les souches isolées et purifiées sont testées pour leur capacité de dégrader certains composés organiques naturels (la cellulose et les substances pectiques) ou xénobiotiques (le 2,5-xylénol et le 2,6-xylénol). Sur l'ensemble des trente neuf souches purifiées, dix huit souches sont actives sur au moins l'un des substrats étudié. Une seule souche métabolise les quatre substrats étudiés.

Parmi les souches actives, douze sont cellulolytiques, treize sont pectinolytiques, sept et onze utilisent, respectivement, le 2,5-xylénol et le 2,6-xylénol comme unique source de carbone et d'énergie. Quatre et six souches utilisant les composés toxiques tolèrent, respectivement, de fortes concentrations de 2,5-xylénol et de 2,6-xylénol jusqu'à 3000mg/l dans le milieu de culture.

L'étude des caractéristiques morphologiques, physiologiques, biochimiques et les colorations cellulaires ont permis de rapprocher dix des souches actives au genre *Streptomyces*, trois au genre *Mycobacterium*, deux au genre *Micromonospora*, une au genre *Nocardia*, une au genre *Rhodococcus* et une au genre *Cellulomonas*.

Mots clés : Actinomycètes, biodégradation, composés organiques naturels, cellulose, substances pectiques, xénobiotiques, 2,5-Xylénol, 2,6-Xylénol.

Laboratoire de recherche : laboratoire de génie microbiologique et applications.

Membres de jury :

Président : Mr. Bousseboua H.	Prof. Univ. Constantine
Rapporteur : Mr. Boulahrouf A.	Prof. Univ. Constantine
Examineurs : Mme. Mechakra A.	M.C. Univ. Constantine
Mr. Kitouni.M	M.C. Univ. Constantine