

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université A. MIRA - Bejaia

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Microbiologie
Spécialité : Biotechnologie Microbienne



Réf :

Mémoire de Fin de Cycle
En vue de l'obtention du diplôme

MASTER

Thème

**Caractérisation de souches
d'actinobacteries résistantes au Zinc et au
Plomb**

Présenté par :

KARI Thiziri & KACI Chahrazed

Soutenu le : **14 Juillet 2022**

Devant le jury composé de :

M. KECHA Mouloud	Professeur	Président
M^{me} DJINNI Ibtissem	MCA	Examinatrice
M^{me} ARKOUB Warda	MCA	Encadreur
M^{elle} RETI Wissam	Doctorante	Invitée

Année universitaire : 2021/2022

REMERCIEMENTS

Nous remercions Allah le tout puissant de nous avoir donné la santé, la volonté, la patience et le courage nécessaires pour la concrétisation de ce travail.

Nous adressons notre profonde gratitude à notre promotrice **Mme ARKOUB Warda**, d'avoir accepté de nous encadrer, pour ses orientations, sa motivation professionnelle, pour sa patience et son encouragement. Son œil critique nous a été très précieux pour structurer notre travail et pour améliorer la qualité des différentes sections.

Nous tenons à exprimer notre reconnaissance envers le **Professeur KECHA Mouloud** et le **Docteur DJINNI Ibtissem**, et les remercier pour le temps et les efforts qu'ils consacrent à l'évaluation de notre travail.

Nous tenons également à remercier les deux doctorantes du laboratoire de Microbiologie Appliquée : **RETI Wissam** et **BELABBAS Hanane** pour leurs aide précieuse et leurs conseils. Elles ont veillé à nous fournir un bon environnement de travail, qui nous a permis d'atteindre ces résultats.

Enfin, nous voulons remercier toute personne qui a contribué explicitement ou implicitement, de loin ou de près, à la réalisation de ce mémoire.

Dédicace

C'est avec beaucoup d'amour que je dédie ce travail

A mes chers parents, pour leurs sacrifices, leurs amours, leurs tendresses, leurs soutiens et leurs prières tout au long de mes études.

A ma meilleure amie ma binôme pour son soutien morale et encouragement tout au long de notre parcours universitaire.

Sans oublier mes tantes Nassima et Fouzia qui m'ont conseillée, que dieu les protège.

KACI Chahrazed

Dédicace

C'est avec beaucoup d'amour que je dédie ce travail :

À mes grands-parents qui m'ont élevé avec tant d'amour,

À mes très chers parents,

À mes tantes,

À mes chers frères et sœur,

À mon meilleur ami,

À ma coéquipière Chahrazed,

À mes amies et amis,

À tous ceux qui, par un mot, m'ont donné la force de continuer.

KARI Thiziri

Liste des figures

Liste de abréviations

Introduction 1

Sommaire

Chapitre I : Synthèse Bibliographique..... 2

1. Métaux lourds..... 4

1.1 Définition 4

1.2 Origines..... 4

1.2.1 Origines naturelles 4

1.2.2 Origines anthropiques 5

1.3 Pollution par les métaux lourds..... 5

1.4 Microorganismes résistants aux métaux lourds 6

2. Les actinobacteries..... 6

2.1 Généralités..... 6

2.2 Ecologie..... 7

2.3 Taxonomie 7

2.4 Importance des actinobactéries 8

3. La résistance des actinobacteries aux métaux lourds..... 9

Chapitre II : Matériel et Méthodes..... 11

1 Matériel 12

1.1 Matériel analytique..... 12

1.2 Matériel biologique..... 12

1.2.1 Microorganismes étudiés..... 12

1.2.2 Germes cibles utilisés 13

2 Méthodes 13

2.1 Etude des caractères morphologiques des souches..... 13

2.1.1 Etude macromorphologique 13

2.1.2 Etude micromorphologique 14

2.2 Etude des caractères physiologiques des souches 14

2.2.1 Production de pigments mélanoides..... 14

2.2.2	Dégradation de divers composés organiques	14
2.2.3	Tests de sensibilité à divers agents physiques et chimiques	16
2.3	Mise en évidence de l'activité antagoniste	17
2.3.1	Culture des souches	17
2.3.2	Méthode des cylindres d'agar	17
Chapitre III : Résultats et discussion		21
1	Caractères morphologiques des souches isolées	21
1.1	Caractères macromorphologique.....	21
1.2	Caractères micromorphologiques	24
2	Caractères physiologiques des souches.....	25
2.1	Production de pigments mélanoides	25
2.2	Dégradation de divers composés organiques	26
2.2.1	Les sucres	26
2.2.2	Les acides aminés.....	26
2.2.3	Activités enzymatiques	26
2.2.4	Utilisation des sels de sodium	30
2.3	Tests de sensibilité à divers agents physiques et chimiques.....	30
2.3.1	Le potentiel d'hydrogène pH.....	30
2.3.2	La température.....	30
2.3.3	Tolérance à différentes concentrations de NaCl.....	31
2.3.4	Mise en évidence de la résistance aux antibiotiques	32
3	Mise en évidence de l'activité antagoniste	33
3.1	Activité antibactérienne	33
3.2	Activité antifongique	35
Conclusion		38

Références bibliographiques

ANNEXE

Résumé

Liste des figures

Figures N°	Titre	Page
1	Origine des métaux lourds dans le sol (Robert et Juste., 1999)	4
2	Application biotechnologique des actinobactéries (Anandan., 2016)	8
3	Vue générale du site de prélèvement	13
4	Mise en évidence de l'activité antibiotique des souches d'actinobactéries sur milieu Mueller-Hinton par la méthode des cylindres d'agar (Bastide et al., 1986)	19
5	Caractéristiques morphologiques et culturales sur les milieux ISP et milieu SCA de l'isolat TC1 après 21 jours d'incubation	21
6	Caractéristiques morphologiques et culturales sur les milieux ISP et milieu SCA après 21 jours d'incubation de l'isolat TC2	23
7	Observation microscopique du mycélium aérien de la souche TC1 ; (a) au grossissement (Gx4), (b) (Gx10), (c) (Gx40) et la chaîne sporale (d) (Gx40)	24
8	Observation microscopique du mycélium aérien de la souche TC2 ; (a) au grossissement (Gx4), (b) (Gx10), (c) (Gx40) et la forme des spores (d) (Gx40)	25
9	Hydrolyse de la caséine du lait par les deux souches TC1 et TC2	27
10	Hydrolyse de l'amidon par les deux souches TC1 et TC2	27
11	Hydrolyse de la cellulose par les deux souches TC1 et TC2	28
12	Hydrolyse des lipides par les deux souches TC1 et TC2.	28
13	Dégradation des sels de sodium par les TC1 et TC2. A : Acétate de sodium ; B : Oxalate de sodium	30
14	Pigmentation de TC1 sur différentes concentrations de NaCl	32
15	Activité antimicrobiennes de la souche TC1 en présence et absence du métal (Zinc) à l'égard des germes cible	34
16	Activité antimicrobiennes de la souche TC2 en présence et absence du métal (Plomb) à l'égard des germes cible	35

Liste des figures

17	Mise en évidence de la résistance de la souche TC2 aux antibiotiques testés	65
18	Photographie illustrant les zones d'inhibitions de l'activité antimicrobienne des souches TC1 et TC2 contre les différents germes cible testés	67

Liste d'abréviations

AMO : Amoxicilline

AMP : Ampicilline

ARG : Gènes de Résistance aux
Antibiotiques

CEF : Céfotaxime

CMI : Concentration Minimale
Inhibitrice

COL : Colistine

ETM : Eléments –Traces Métalliques

ISP : International Streptomyces Project

MA : Mycélium Aérien

MH : Mueller Hinton

MS : Mycélium de Substrat

OXA : Acide Oxalinique

Sb: Antimoine

SCA: Starch Casein Agar

Introduction

Le problème de la pollution de l'environnement concerne le monde entier. En raison de plusieurs activités d'origine humaine telles que l'urbanisation, les progrès technologiques, les pratiques agricoles dangereuses et l'industrialisation, la pollution de l'environnement continue d'augmenter à un rythme alarmant (**Ojuederie et Babalola, 2017**). Les métaux lourds sont les polluants les plus fréquemment rencontrés dans le sol (**Cimino, 2005**). La pollution des biotopes par ces derniers devient l'un des risques environnementaux les plus graves. Des niveaux élevés de métaux lourds diminuent non seulement l'activité microbienne du sol et la production agricole, mais menacent également la santé humaine tout au long de la chaîne alimentaire (**McLaughlin et al., 1999**).

Une variété de méthodes physiques et chimiques conventionnelles tels que les précipitations chimiques, l'adsorption, les procédés membranaires et l'échange d'ions est disponible pour l'élimination des métaux lourds de l'environnement. Néanmoins, ils sont coûteux et peu écologiques. En conséquence, l'utilisation de micro-organismes est apparue comme une option pour développer des procédés économiques et respectueux de l'environnement tels que la bioaccumulation et la biosorption (**Timkovà et al., 2018**).

Les actinobactéries sont des bactéries écologiquement abondantes et métaboliquement polyvalentes, elles sont bien connues pour leur capacité à produire des métabolites secondaires et une richesse de produits naturels avec diverses applications, on fait d'elles de bonnes candidates comme agents pour la bioremédiation des composés inorganiques et organiques (**El Baz, 2017 ; Bankar et al., 2018**).

L'objectif du présent travail est la caractérisation de deux souches d'actinobactéries résistantes aux métaux lourds isolées à partir du sol d'une décharge publique afin de les identifier nommées **TC1** (résistante au Zinc) et **TC2** (résistante au Plomb).

Ce mémoire comporte essentiellement trois chapitres :

Le premier chapitre de ce manuscrit est consacré à une synthèse bibliographique détaillée sur les actinobactéries en générale où nous présenterons leur écologie, taxonomie, résistance aux métaux lourds et leur importance. Le deuxième chapitre est consacré à l'ensemble des expériences réalisées dans le cadre de cette problématique regroupant le matériel et le différent procédé méthodologique mis en œuvre pour la caractérisation des souches d'actinobactéries résistante au Plomb et au zinc ; l'étude morphologique et physiologique des souches étudiées, la mise en évidence de leurs activités antagonistes. Enfin le troisième chapitre présente les résultats obtenus et leurs discussions.

Chapitre I : Synthèse Bibliographique

1. Métaux lourds

1.1 Définition

Le terme métaux lourds est un mot ambigu dont la définition varie d'une source à l'autre (**Baker et Walker., 1990**) ; il tend à être remplacé par la notion d'éléments-traces métalliques (ou ETM) (**Miquel., 2001**), jusqu'à présent (2022) il n'existe pas de définition générale.

Il existe deux types de métaux lourds en fonction de leurs effets physiologiques et toxiques : métaux essentiels qui sont nécessaires à l'organisme en petites quantités (**Loué, 1993**), et peuvent devenir toxiques à doses plus importantes, c'est le cas du Cuivre (Cu), du Nickel (Ni), du Zinc (Zn), du Fer (Fe) (**Kabata-Pendias et Pendias., 2001**), et les métaux toxiques tels que le Mercure (Hg), le Plomb (Pb), le Cadmium (Cd) et l'antimoine (Sb), qui ne sont pas nécessaires même à faible concentration (**Chiffolleau et al., 2001**).

1.2 Origines

Le problème majeur des métaux lourds est qu'ils ne peuvent pas être dégradés facilement, et donc persistent pendant de longues périodes dans l'environnement. Leur présence dans l'environnement peut être d'origine humaine (anthropogène) ou naturelle (géogène) (**Robert et Juste, 1999**) (figure 1).

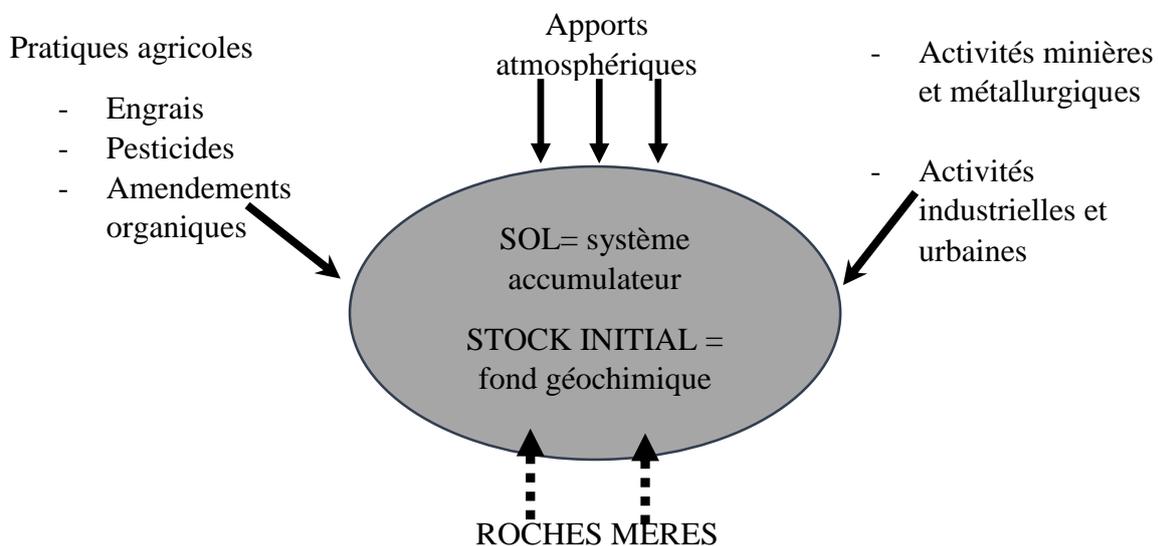


Figure 1: Origine des métaux lourds dans le sol (**Robert et Juste, 1999**)

1.2.1 Origines naturelles

Les métaux lourds sont présents naturellement dans les roches (**Bpurrelier et Berthlin., 1998**). Ils sont introduits dans la biosphère via l'activité volcanique (émissions de Cd, Hg, Cu, Pb), ou par les incendies de forêts (**Stonge et al., 2002** ; **Gelabert et al., 2006**).

1.2.2 Origines anthropiques

Les teneurs les plus élevées en éléments inorganiques rencontrées dans le sol sont fortement liées à l'activité humaine (**tableau I**). Elles sont en premier lieu liées aux activités de transformation primaire des métaux (industries d'extraction) (**Gelabert et al., 2006**). D'autre part les rejets urbains (les transports, l'incinération des déchets), et industriels (**Baize, 1997**) et la pollution liée aux activités agricoles (engrais et compostes).

Tableau I : Principales sources anthropiques de pollution du sol par les métaux lourds les plus fréquentes (**Hashida et al., 2002 ; Liu et al., 2004**)

Sources de pollution	Métaux
Batteries et autres appareils électriques	Cd, Hg, Pb, Zn, Mn, Ni,
Pigments et peintures	Ti, Cd, Hg, Pb, Zn, Mn, Sn, Cr, Al, As, Cu, Fe
Alliages et soudures	Cd, As, Pb, Zn, Mn, Sn, Ni, Cu
Verre	As, Sn, Mn
Produits dentaires et cosmétiques	Sn, Hg
Raffineries	Ni, V, Pb, Fe, Mn, Zn

1.3 Pollution par les métaux lourds

La contamination de sol par des métaux toxiques est l'un des plus grands problèmes environnementaux à l'échelle mondiale (**Janssen et al., 2015**). Une pollution du sol est considérée lorsque les composés introduits altèrent son fonctionnement ou constituent une menace pour la santé humaine (**Masciandaro et al., 2013**).

➤ Le Plomb

Le Plomb (Pb) qui vient de nom latin « plumbum » est l'un des métaux qui a été le plus anciennement et le plus largement utilisé par l'homme (**R.Garnier, 2005**). L'accumulation de Pb se fait principalement dans les horizons de surface (**Steckeman et al., 2000**) et plus précisément dans les horizons riches en matière organique. Les teneurs en Pb diminuent, ensuite, plus en profondeur (**Abreu et al., 1998**), ceci s'explique par le fait que le Pb est peu mobile.

➤ Le Zinc

Le Zinc (Zn) est un élément relativement abondant. Il représente 0,004 % de la croûte terrestre. Sa teneur moyenne dans la croûte terrestre varie entre 70 et 132 mg/kg (**Baize., 1997**). Il est très peu soluble dans l'eau sous sa forme de carbonate, d'oxyde ou de sulfure, contrairement au sulfate de zinc qui eux sont très solubles dans l'eau (**Canada., 2016**).

1.4 Microorganismes résistants aux métaux lourds

Il existe des microorganismes qui sont capables de survivre dans des milieux naturels contaminés par les métaux lourds à effet toxique, même à une forte concentration. Parmi ces dernières on trouve *Cupriavidus metallidurans* CH34, anciennement connue sous le nom de *Wautersia metallidurans*, elle a été caractérisée comme résistante au zinc (Zn), cadmium (Cd), cobalt (Co), et nickel (Ni) (**Mergeay et al., 1985**).

On trouve également les champignons : des moisissures et des levures. *Neurospora sitophila*, *Penicillium chrysogenum* et *Penicillium lilacinum*, utile pour l'élimination de certains métaux lourds, en particulier l'uranium (**Nakajimaç et Sakaguchi, 1986 ; Gavrilesco, 2004 ; Wang et Chen, 2009 ; Juwarkar et Yadav, 2010**). Les bactéries ont été utilisées comme biosorbants en raison de leur petite taille, leur abondance dans la terre, et leur capacité à croître dans des conditions contrôlées. Certaines espèces bactériennes telles que *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Streptomyces*, *Escherichia*, *Micrococcus*, etc, ont été testés pour l'absorption des métaux ou des composés organiques (**Juwarkar et Yadav., 2010**).

2. Les actinobactéries

2.1 Généralités

Les actinobactéries ont été considérées comme un groupe intermédiaire entre bactéries et champignons. Actuellement, elles sont reconnues comme des organismes procaryotes, présentant des similitudes à la fois avec les bactéries et les moisissures (**Andriambololona., 2010**). Ce sont des bactéries dont la croissance donne lieu à des colonies circulaires à la morphologie complexe (**Eunice et Prosser., 1983 ; Colombie., 2005**), formant des filaments minces, septés et ramifiés (**Dgigal., 2003**) ; possédant un coefficient de Chargaff (GC%) élevé compris entre 60-70% (**Larpent et Sanglier., 1989**).

La plupart des espèces sont immobiles, hétérotrophes mais certaines sont chimio-autotrophes (**Ensign et al., 1993**), aérobie bien qu'il existe des formes anaérobies regroupant généralement des espèces pathogènes, mésophiles et se développent de façon optimale dans la

gamme de pH 5 à 9 avec une proximité optimale à la neutralité (**Goodfellow et Williams., 1983**). Ces micro-organismes comptent des formes peu évoluées comme le genre *Mycobacterium*, ou très évoluées, comme le genre *Streptomyces* qui forme un mycélium du substrat, surmonté par un mycélium aérien sporulant, non fragmenté qui leur confère un aspect fongique (**Lamari., 2006**). La majorité des actinobactéries sont capables de former des spores, dotées de capacité de survie dans des conditions extrêmes telles que la salinité, et jouent un rôle important dans la dispersion par le vent et les courants d'eau (**Zaitlin et Watson., 2006**).

2.2 Ecologie

Les actinobactéries sont des microorganismes ubiquitaires que l'on rencontre sur tous les substrats naturels (**Peraud., 2006**). Elles peuvent se développer à l'état libre ou en association avec les plantes non légumineuses (symbiose) (**Verma et al., 2009**) comme le genre *Frankia* (**Benson et Silvester., 1993**).

Ils ont des aptitudes à coloniser de nombreux milieux à partir du sol (air, compost, fourrages, graines, etc ...) (**Badji., 2006 ; Perand., 2006**). Ces microorganismes sont retrouvés dans les eaux douces : les lacs, les rivières, les ruisseaux, ainsi dans les eaux salées : les mers, les océans (**Weyland., 1986 ; Sabaou, 1988 ; Singh et al., 2007**).

2.3 Taxonomie

La taxonomie des actinobactéries a beaucoup évolué au cours des vingt à trente dernières années (**Zermane., 2007**). La classification établie des groupes taxonomiques (taxon). Ceux-ci sont établis selon des critères phénotypiques et moléculaires à défaut de bases phylogéniques (**Kitouni., 2007**). Les actinobactéries appartiennent au règne des procaryotes, sont classées dans le phylum des Actinobacteria à la classe des Actinobacteriaceae qui comporte six ordres parmi lesquels figure l'ordre des Actinomycetales s'avère le plus important (**Bergey's Manual., 2012**).

La famille des Actinomycètes est constituée d'une quarantaine de genres qui se distinguent les uns des autres essentiellement sur la base de leur morphologie qui est très diversifiée, allant de la forme Cocci (*Micrococcus*) ou batonnet-cocci (*Arthorobacter*) en passant par ceux formant des hyphes qui se divisent (*Nocardia, Rhodococcus*) et ceux qui possèdent un mycélium persistant et bien différencié (*Streptomyces, Actinomadura, Micromonospora, etc...*) (**Oskay et al., 2004 ; Srivibool et Sukchotiratana., 2006**).

2.4 Importance des actinobactéries

Les actinobactéries possèdent des rôles importants dans divers domaines (**figure 2**), tels que le secteur industriel et en particulier pharmaceutique dont ils sont la plupart des antibiotiques utilisés en médecine aujourd'hui (**Prescott et al., 2003**). L'hétérogénéité biochimique des actinobactéries et leur exceptionnelle capacité à produire des métabolites secondaires font d'eux des producteurs potentiels de nombreuses molécules actives d'intérêt biotechnologique telles que : les antibiotiques, les antifongiques (**Parungao et al., 2007**), des antiparasitaires (**Oskay et al., 2004**), des anti tumoraux (**Kim et al., 2006**), des antidépresseurs, les vitamines et les enzymes...etc.

De plus, elles comptent parmi un nombre important d'organismes utilisés en bioremédiation qui est une technologie qui utilise des micro-organismes pour réduire, éliminer, contenir ou transformer les contaminants du sol, des sédiments, de l'eau et de l'air en produits bénins. (**Goodfellow et Williams, 1983 ; Nabir, 2003**). Citant à titre exemple *Streptomyces sp* WR1L1S8 (**Djinni et Djoudi, 2021**) *Streptomyces chromofuscus* (**Daboor et al., 2016**) *Streptomyces werraensis* LD22 (**S. Latha et al., 2014**) qui ont la capacité de dégrader les métaux lourds.

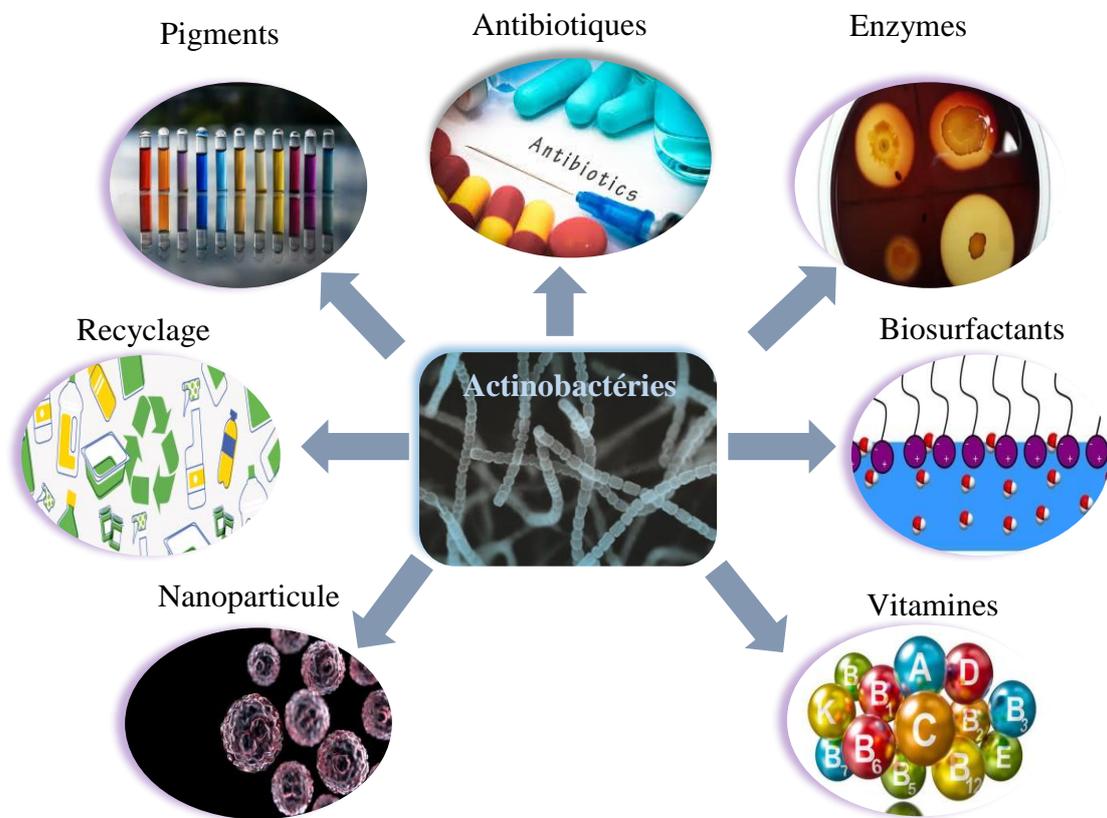


Figure 2 : application biotechnologique des actinobactéries (**Anandan, 2016**)

3. La résistance des actinobactéries aux métaux lourds et leurs mécanismes de résistance

Certains microorganismes ont su répondre au cours du temps à la toxicité des métaux lourds en devenant tolérants ou résistants à ces derniers. Ils sont ainsi devenus capables de survivre dans des milieux hautement pollués (**Gadd, 1992**). Afin de remédier au problème de pollution, l'identification de nouvelles souches d'actinobactéries résistantes aux métaux lourds a fait l'objet de plusieurs études. En (2014) Soraia El Baz et al, ont mis en évidence deux genres d'actinobactéries : *Streptomyces* et *Amycolatopsis* qui présentent une CMI de 0,55 pour le Pb, de 0,15 pour le Cr et de 0,10 mg·mL⁻¹ pour le Zn et le Cu (**Soraia El Baz et al., 2014**). Egalement l'espèce *Chryseobacterium solincola* qui a été étudiée par Yamina Benmalek et al, en (2014), pour sa résistance aux métaux lourds (Plomb, Chrome, Nickel, Zinc, Cadmium, Cuivre et Cobalt). Cette dernière présentait des valeurs élevées de concentration minimale inhibitrice (CMI) pour l'ion métalliques testé allant de 75 mg/l à 500 mg/l, La souche a pu accumuler plus de 90 % de plomb et de zinc au cours du cycle de croissance actif (**Yamina Benmalek et al., 2014**). Ainsi Bo-Ram Yun et al en (2020) ont signalés *Kitasatospora sp* MMS16-BH015, une souche tolérante aux métaux lourds. Cette dernière a été capable de tolérer jusqu'à 100 mM de Zn (sous forme de ZnSO₄·5H₂O), 2 mM de Ni (sous forme de NiCl₂) et 0,8 mM de Cu (sous forme de CuSO₄·7H₂O) (**Yun et al., 2020**). Tableau (II) résume les actinobactéries résistantes aux métaux isolés de différentes sources.

Les cellules des actinobactéries ont plusieurs mécanismes inhérents par lesquels elles peuvent tolérer de fortes concentrations de métaux. Elles ont la capacité de modifier la toxicité des métaux lourds en utilisant divers mécanismes indépendants des métaux tels que la restriction de l'entrée des métaux lourds dans les cellules microbiennes soit en réduisant l'absorption soit par la formation de complexes métalliques à l'extérieur de la cellule, la séquestration des métaux intracellulaires, la sidérophore-métal complexation et exclusion par des barrières de perméabilité. Les mutations et les mécanismes de réparation de l'ADN jouent un rôle crucial dans la protection de l'ADN plasmidique et génomique.

Tableau II : Les actinobactéries résistantes aux métaux lourds isolées de différentes sources (Ashok banker et Geetha nagaraja., 2018)

Actinobactéries	Résistance aux métaux	Sources d'actinobactéries	Référence
<i>Streptomyces lividans</i> TK24	Cd et Cu	Fleuve	Amoroso et al. (1998)
<i>Frankia</i>	Pb et Cu	Plantes ligneuses dicotylédones	Richards et al. (2002)
<i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2) (DSM40783)	Ni,Co,Cu et Cd	Sol	Schmidt et al. (2005)
<i>Actinomycètes</i>	Cu	Effluent contaminé au cuivre	Albarracin et al. (2005)
<i>Streptomyces resistomycificus</i> NBRC12814T	Pb	Sol pollué par Pb	Guo et al. (2009)
<i>Streptomyces spp.</i> VITDDK1	Cd, Ni,Cu, Zn,Pb, Co, Cr, et As	Sol marin	Lakshmipathy et Kannabiran (2010)
<i>Streptomyces roseisederoticus</i>	Cr, Cd, Zn et Pb	Sol de la rhisphère	Vinod et al. (2014)
<i>Streptomyces sp.</i> MC1	Cr (V)	Canne à sucre contaminée	Polti et al. (2014)
<i>Actinomycetes</i> (Ash1 to Ash 15)	Cu, Zn, et Pb	Sol	Singh et al. (2014)
<i>Streptomyces sp.</i> UTMC 2179	Ni et Zn	Sol à haute teneur en métaux	Hamediet al. (2015)
<i>Promicromonospora sp.</i> UTMC 2243	Ni et Zn		
<i>Streptosporangium sp.</i> UTMC 2188	Ni et Zn		
<i>Streptomyces sp.</i> UTMC 2244	Ni et Zn		
<i>Nonomuraea sp.</i> UTMC 2237	Ni et Zn		
<i>Streptomyces flavomacrosporus</i>	Hg et Pb	Riziére contaminée	Sunil et al. (2015)
<i>Streptomyces sp.</i> ww1	Cu, Cd, Ni et Pb	Station de traitement des eaux usées	Ahuras (2016)

Chapitre II : Matériel et Méthodes

Cette étude a été réalisée au niveau de Laboratoire de Microbiologie Appliquée (LMA) et Génie biologique de l'Université A. Mira de Bejaia, durant la période allant du 12/04/2022 au 31/05/2022.

1 Matériel

1.1 Matériel analytique

Le matériel utilisé dans cette étude est résumé en annexe I.

1.2 Matériel biologique

1.2.1 Microorganismes étudiés

Les souches d'actinobactéries notées **(TC2) (résistante au plomb)**, **(TC1) (résistante au zinc)** étudiées dans ce travail appartiennent à la collection du Laboratoire de Microbiologie Appliquée (LMA) de l'Université A. Mira de Bejaia. Elles ont été isolées par M^{elle} RETI Wissam dans le cadre d'un projet de recherche à partir des échantillons prélevés de la décharge publique de Boulimat à Béjaia en Septembre 2021 (**Figure 3**). Les deux isolats ont été isolés dans un milieu sélectif contenant 100 mg/l des deux métaux, un test supplémentaire a été effectuer pour déterminer la CMI pour les deux souches (4 g/l du Zinc pour TC1 et 4 g/l du Plomb pour TC1).

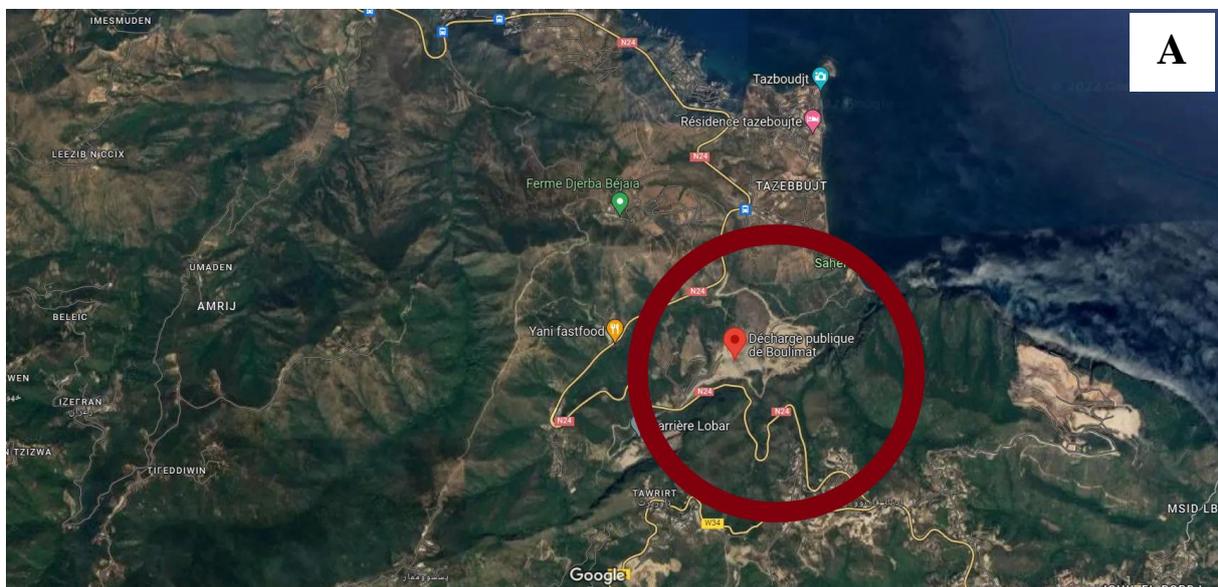




Figure 3: Vue générale du site de prélèvement

1.2.2 Germes cibles utilisés

- **Bactéries à Gram positif**

- *Staphylococcus epidermidis*; ATCC 6538
- *Bacillus subtilis*; (Laboratory strains, 3BS)
- *Bacillus cereus* ; (Laboratory strains 3BS)
- *Staphylococcus aureus* ; ATCC 6538 (SAIDAL- Antibiotical)
- SARM ; ATCC 43300

- **Bactéries à Gram négatif**

- *Enterococcus faecalis*. (Laboratory strains, 3BS)
- *Acinetobacter baumannii*; 610
- *Escherichia coli*; ATCC 25922
- *Klebsiella pneumoniae*; (Laboratory strains, 3BS)
- *Pseudomonas aeruginosa*; ATCC 6633
- *Salmonella Typhi*; (Laboratory strains, 3BS)
- *Vibrio cholerae*.

- **Souches fongiques :**

- *Aspergillus niger*.
- *Penicillium* sp.

2 Méthodes

2.1 Etude des caractères morphologiques des souches

2.1.1 Etude macromorphologique

Cette étude consiste à déterminer la couleur des mycéliums aériens (MA) et du substrat (MS) ainsi que les pigments solubles produits sur différents milieux de culture préconisés par

« International *Streptomyces* Project » ISP (**Shirling et Gottlieb, 1966**) (ISP1, ISP2, ISP3, ISP4, ISP5) et Starch Casein Agar (SCA). La lecture est faite après 3, 7, 14 et 21 jours d'incubation à 28°C. La composition de ces milieux est donnée en annexe II.

2.1.2 Etude micromorphologique

Les deux souches étudiées (**TC1** et **TC2**) sont observées à l'aide d'un microscope optique à un grossissement (x4), (x10), (x40) après 14 jours d'incubation à 28°C.

Ces observations sont réalisées directement sur les boîtes de Pétri et ce pour étudier les mycéliums en place sans en altérer les structures. Elle consiste à voir également la sporulation caractéristique des souches ainsi que la forme et la taille des spores et la fragmentation du mycélium aérien (**Williams et al., 1989**).

2.2 Etude des caractères physiologiques des souches

2.2.1 Production de pigments mélanoides

Les actinobactéries sont caractérisées par la production de divers pigments sur des milieux naturels ou synthétiques, qui sont considérés comme un critère utile pour les études taxonomiques (**Goodfellow et al., 2012**).

La production de pigments mélanoides par les isolats est observée sur milieu gélosé ISP7.

2.2.2 Dégradation de divers composés organiques

➤ Les sucres

Les composés glucidiques peuvent être dégradés par de nombreuses bactéries suivant deux grandes voies : l'oxydation (en aérobiose) et la fermentation (en anaérobiose).

Cette étude est réalisée sur milieu ISP9 (**Shirling et Gottlieb, 1966**).

Les composés glucidiques testés sont les suivantes : D-glucose, Arabinose, Fructose, Cellobiose, Galactose, Lactose, Rhamnose, Xylose, Mannose, Saccharose, fructose et Tryptose. Les solutions à 1% sont stérilisées séparément à 120°C pendant 20min puis ajoutés au milieu ISP9 préalablement préparé lors de l'utilisation.

Les boîtesensemencées sont incubées à 28°C pendant 14 jours et la croissance est estimée par l'appréciation du développement des mycéliums aériens et du substrat en comparaison au témoin.

Remarque : Témoin négatif= ISP9 seul et témoin positif = ISP9 + glucose.

➤ Les acides aminés

Cette étude est réalisée sur milieu ISP9 (Shirling et Gottlieb, 1966).

Les acides aminés testés sont : Acide Glutamique, L.histidine, Sérine, L.lysine, Alanine et Arginine. Les solutions à 1% de ces derniers sont préparées et stérilisés par un filtre seringue (0.45 µm) puis ajoutés aux milieux lors de la préparation. Les lectures s'effectuent après 7 à 14 jours d'incubation à 28°C. Le test positif se manifeste par une croissance de la souche.

➤ Hydrolyse des protéines

Les enzymes protéolytiques (protéases ou protéinases) font partie de la classe des hydrolases, ce sont des enzymes qui catalysent les protéines dans des sites bien spécifiques en scindant la liaison peptidique qui lie deux acides aminés dans une chaîne peptidique. Elles sont produites extracellulairement comme intracellulairement (Kumar et al., 2008).

Ce test est réalisé en ensemençant les deux souches en stries sur milieu gélosé contenant 5% de lait écrémé, après 7 jours d'incubation à 28 °C. La dégradation de la caséine du lait se traduit par la présence d'un anneau clair autour des colonies de la souche (De vos et al., 2009).

➤ Hydrolyse de l'amidon

Amylase, est une macromolécule qui fait partie de la classe des protéines globulaires. Elle hydrolyse au hasard les liaisons osidiques (1,4), de l'amylose, de l'amylopectine, de l'amidon et du glycogène à l'exclusion des liaisons terminales de ces chaînes. Elle provoque la libération du glucose, du maltose et surtout d' α -dextrines (Benaouida, 2008).

Le test qui indique l'activité amylolytique a été réalisé sur une gélose à base d'amidon (milieu Gausse), Un ensemencement du milieu par stries. Après incubation pendant 7 jours à 28°C une solution de lugol a été dispersée sur toute la surface du milieu. Après quelques minutes de contact, l'excès a été éliminé. La présence d'amidon est révélée par la présence de la couleur bleue et la production d'amylase est traduite par la transparence autour des colonies.

➤ Hydrolyse de la cellulose

Les cellulases sont des enzymes qui sont synthétisées par des micro-organismes lors de leur croissance sur des matières cellulosiques (Gaur et al., 2015).

La recherche de l'activité cellulosique a été réalisée sur un milieu carboxy méthyl cellulose (CMC). Après 7 jours d'incubation à 28°C, une solution de rouge de Congo à 1 % préalablement préparée a été dispersée sur toute la surface du milieu Après cinq minutes de

contact, l'excès a été éliminé et les boîtes sont rincées avec du NaCl. L'apparition d'un halo jaunâtre indique la production d'enzyme (cellulase).

➤ **Hydrolyse des lipides (tween 80)**

Les lipases sont largement répandues chez les bactéries, les levures et les champignons filamenteux. Les lipases sont des enzymes hydrosolubles capables d'effectuer l'hydrolyse de fonctions esters et sont spécialisées dans la transformation de glycéride en glycérol, des diglycérides, des monoglycérides et des acides gras (**Salwan et al., 2018**).

L'activité estérasique a été testée sur le milieu de culture Sierra additionné de Tween 80 puis incubés à 28°C pendant 7 jours. La présence d'une activité estérasique est traduite par l'apparition d'un halo opaque autour des colonies.

➤ **Utilisation des sels de sodium : Oxalate et Acétate**

Les acides organiques de faible poids moléculaire, tels que l'acétate, l'oxylate, sont utilisés comme seules sources de carbone et d'énergie par de nombreuses bactéries et sont métabolisés par les cycles tardifs de l'acide tricarboxylique et du glyoxylate (**Prescott et al., 1995 ; Lengeler et al., 1999**).

La dégradation d'oxalate et de l'acétate a été mise en évidence en ensemençant les deux isolats (TC1 et TC2) sur le milieu de culture (**Annexe II**). Les boîtes sont par la suite incubées à 28°C et la lecture est faite après 3, 7, 14, et 21 jours. La dégradation est notée positivement après virage de l'indicateur coloré du jaune au rouge-rose.

2.2.3 Tests de sensibilité à divers agents physiques et chimiques

Les tests réalisés consistent à évaluer la croissance bactérienne en présence de différents agents physiques (température), et chimiques (pH, NaCl, résistance aux antibiotiques).

✓ **Température**

Chaque bactérie a une température optimale de croissance. Ce test a pour but la mise en évidence de la capacité des actinobactéries à croître à différentes températures. Les souches sont ensemencées sur le milieu SCA puis incubées à différentes températures (4, 28, 37, 50°C) pendant 21 jours.

✓ Croissance à différentes valeurs de pH

La croissance des deux souches a été évaluée sur milieux SCA à des valeurs de pH initiales de 3.2, 5.2, 7.2, 9.2 et 11.2. Les boîtes sont par la suite incubées à 28°C. La lecture est faite après 3, 7, 14 et 21 jours d'incubation.

✓ Résistance ou sensibilité à différentes concentrations de NaCl

Ce test est réalisé dans le but d'évaluer la résistance des deux souches à des concentrations croissantes de Chlorures de sodium (NaCl) (0,2 - 0,4 - 0,6 - 1 - 1,2 - 1,4 - 1,6 - 2 et 2,5M) sur Milieu SCA pendant 21 jours d'incubation à 28°C.

✓ Mise en évidence de la résistance aux antibiotiques

La résistance et la sensibilité aux antibiotiques des souches résistantes aux Plomb et Zinc sont déterminées selon la méthode de diffusion sur disque de Kirby-Bauer. Les antibiotiques : **Trimethoprime** : Trimethoptine ; Sulphamethoxazole (1,25 ; 1.23 µg), **Ampicilline** : AMP (10 msg), **Amoxicilline** : AMO (25 µg), **Céfotaxime** : CEF (30 µg), **Acide Oxalinique** : OXA (10 µg), **Colistine** : COL (10 µg), **Cefuroxime** : CEF (5 µg), ont été utilisés.

Les boîtes de Pétri contenant la gélose Mueller Hinton (MH) sontensemencées par des stries serrées. Les disques d'antibiotiques ont été placés sur les boîtes inoculées. La lecture est faite après 3, 7, 14 et 21 jours d'incubation à 28°C (Ao-Amer et al., 2013 ; Singh et al., 2013).

2.3 Mise en évidence de l'activité antagoniste

La mise en évidence de l'activité antimicrobienne des souches d'actinobactéries étudiées, est réalisée milieu solide par la méthode des cylindres d'agar (Bastide et al., 1986)

2.3.1 Culture des souches

Consiste à ensemercer les deux souches en stries serrées sur milieux SCA (SCA en absence du métal (100mg/l) et SCA en présence du métal qui sont le zinc pour la TC1 et le plomb pour la TC2) puis incubées à 28°C pendant 7 jours

2.3.2 Méthode des cylindres d'agar

Afin d'avoir un inoculum adéquat, la densité des suspensions bactériennes (germes cibles) est standardisée à 10^7 UFC/ml en prenant quelques colonies du germe cible en suite les mettre dans 5ml de l'eau physiologique stérile. Des boîtes de Mueller Hinton ont étéensemencées avec les suspensions bactériennes. A partir des boîtes de SCA préalablement

ensemencé, des cylindres de 6mm de diamètre sont découpés stérilement à l'aide d'un emporte-pièce puis déposés à la surface du milieu Mueller Hinton préalablement ensemencé par les germes cibles cités précédemment. Les boîtes sont mises à 4C° pendant deux heures afin de permettre la diffusion des substances actives élaborées par les souches testées, puis incubées à 37C° pendant 24 heures pour les souches bactériennes, et à 28°C pendant cinq jours pour les souches fongiques (**figure 4**).

- Le mycélium est en contact avec la gélose.
- L'inoculum ne doit pas être utilisé au-delà de 15 minutes après de sa préparation



a)



Figure 4 (a) : Préparation de la suspension bactérienne



b)



Figure 4 (b) : ensemencement du milieu Mueller Hinton avec la suspension bactérienne



Figure 4 (c) : Préparation et dépôt des cylindres d'agar sur Mueller Hinton

Figure 4 : Mise en évidence de l'activité antibiotique des souches d'actinobactéries sur milieu Mueller-Hinton par la méthode des cylindres d'agar (**Bastide et al., 1986**)

Chapitre III : Résultats et discussion

1 Etude des caractères morphologiques des souches isolées

Pour identifier les souches étudiées, des observations morphologiques ont été réalisées comprenant la forme, la couleur, l'aspect du mycélium aérien (MA) et du substrat (MS) et la production de pigments (Ranjani et al., 2016).

1.1 Caractères macromorphologiques

Les propriétés culturales des deux isolats **TC1** (la souche résistante au zinc) et **TC2** (la souche résistante au plomb), cultivées sur différents milieux ISP (International *Streptomyces* Project) et SCA (Starch Casein Agar) sont rapportées après 21 jours d'incubation à 28°C.

✚ La souche TC1

Les colonies de l'isolat **TC1** cultivées sur divers milieux sont de forme circulaire. Les résultats sont résumés dans le tableau (III). La souche présente une croissance importante sur tous les milieux utilisés (ISP et SCA) (**Figure 5**).

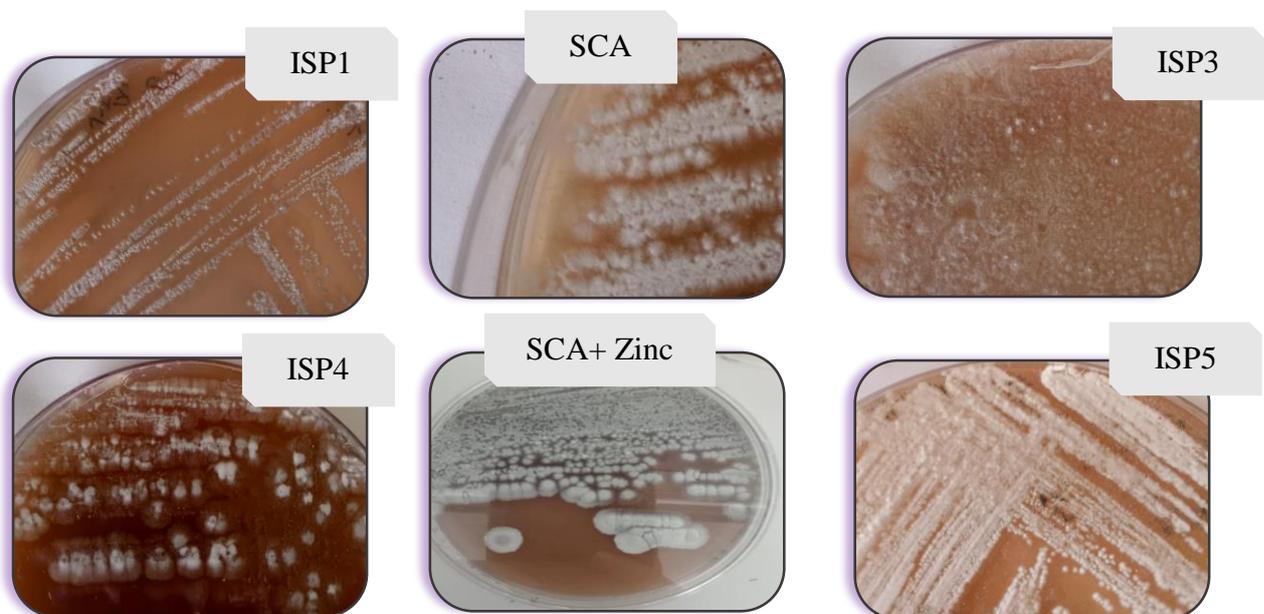


Figure 5 : Caractéristiques morphologiques et culturales sur les milieux ISP et milieu SCA de l'isolat **TC1** après 21 jours d'incubation

Tableau III : Caractères cultureux de l'isolat TC1 après 7 à 21 jours d'incubation

Souche	Milieux de culture	caractère cultureux			Jours d'incubations		
		Couleur et aspect du mycélium aérien	Mycélium du substrat	Pigments solubles	après 7 jours	après 14 jours	après 21 jours
TC1	ISP1	Blanc / teinte grise ; Rugueux	Marron (21j)	Absence	++	+++	+++
	ISP2	Blanc ; Légèrement cotonneux	Beige		+++	+++	+++
	ISP3	Blanc ; Cotonneux	Beige		++	+++	+++
	ISP4	Blanc ; Cotonneux	Marron (mauve 21j)		+	++	+++
	ISP5	Blanc ; Craie	Marron		+++	+++	+++
	SCA	Blanc ; Cotonneux	Beige		+++	+++	+++
	SCA + Métal	Blanc ; Cotonneux	Marron foncé		++	+++	+++

Note : Croissance ou sporulation : +++ : bonne ; ++ : moyenne ; + : faible.

La souche TC2

Les colonies de l'isolat TC2 sont de forme circulaire et légèrement bombée. La souche présente une bonne croissance sur les milieux ISP2, ISP3, ISP4, ISP5 et SCA. Néanmoins, un développement relativement moyen est constaté sur ISP1. Les résultats sont représentés dans le tableau IV et la figure 6 ci-dessous.

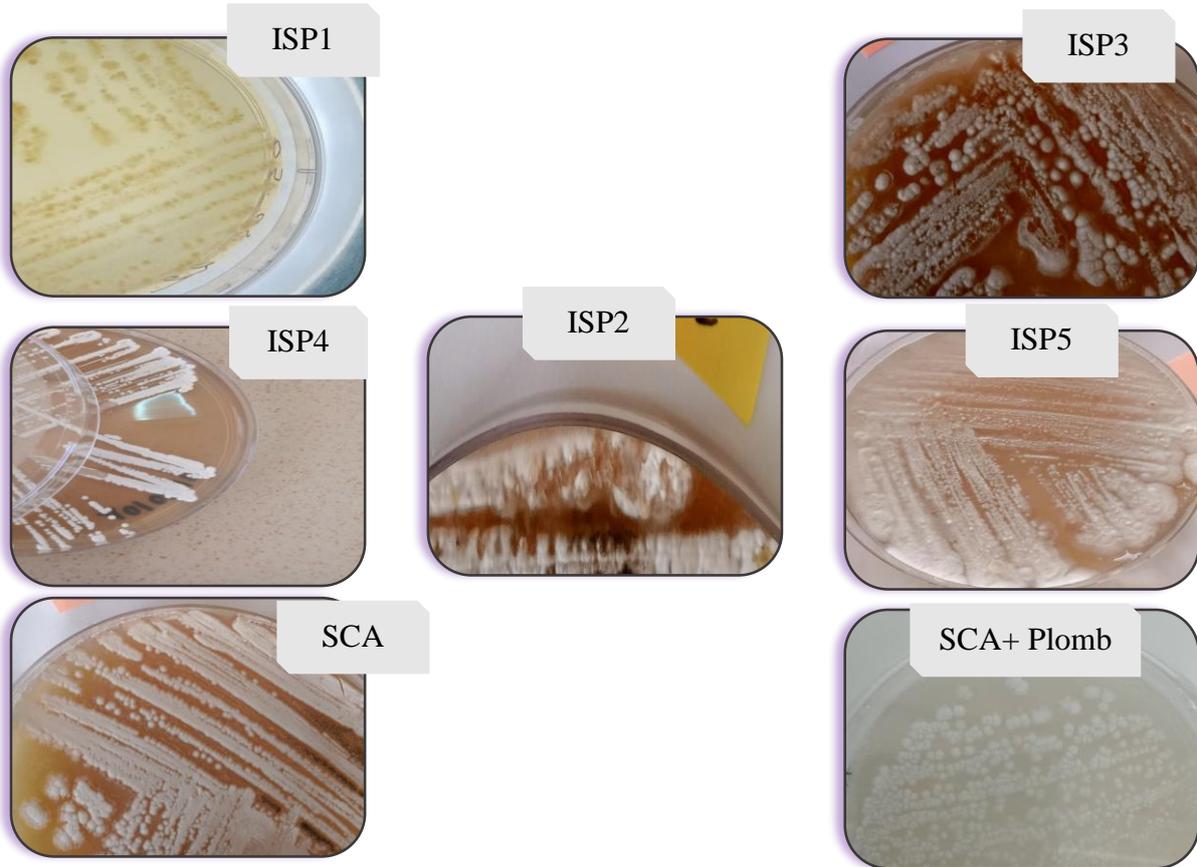


Figure 6 : Caractéristiques morphologiques et culturelles sur les milieux ISP et milieu SCA après 21 jours d'incubation de l'isolat **TC2**

Tableau IV : Caractères cultureux de l'isolat TC2 après 7 à 21 jours d'incubation

Souche	Milieu de culture	caractères cultureux			Jours d'incubations		
		Couleur et aspect du mycélium aérien	Mycélium du substrat	Pigments solubles	après 7 jours	après 14 jours	après 21 jours
TC2	ISP1	Blanc ; Rugueux (riche)	Beige	Absence	+	++	++
	ISP2	Blanc ; Cotonneux	Beige		++	+++	+++
	ISP3	Blanc ; Cotonneux	Beige		++	+++	+++
	ISP4	Blanc ; Craie	Beige		+++	+++	+++
	ISP5	Blanc ; Cotonneux	Beige foncé		+++	+++	+++
	SCA	Blanc ; Cotonneux	Beige		+++	+++	+++
	SCA + Métal	Blanc ; Cotonneux	Beige		++	+++	+++

Note : Croissance ou sporulation : +++ : bonne ; ++ : moyenne ; + : faible.

1.2 Caractères micromorphologiques

Les observations microscopiques réalisées sur des cultures de 14 jours de **TC1** et **TC2** sur milieu SCA, ont permis de mettre en évidence ; la forme des filaments, de la chaîne sporale et des spores de chaque souche. L'observation microscopique des deux souches est illustrée dans les figures 7 et 8.

La souche TC1

Le mycélium de la souche **TC1** est très dense, organisé en pelotes (a) d'où émergent des filaments longs et fins non cloisonnés (c), portant une chaîne sporale en linéaire (d).

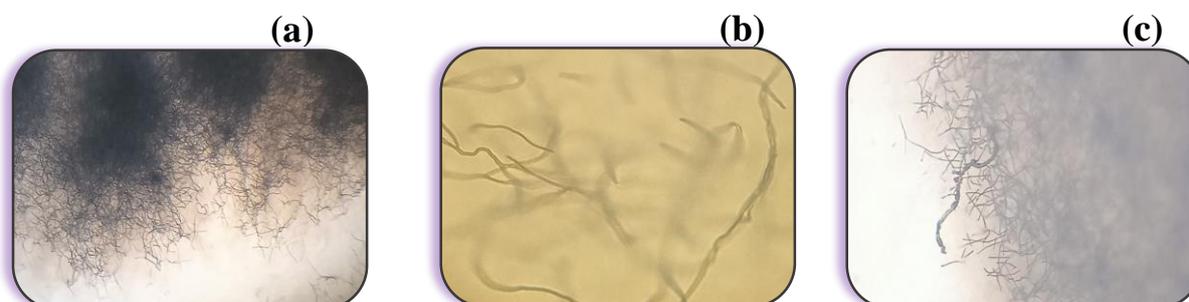


Figure 7 : Observation microscopique du mycélium aérien de la souche **TC1** ; (a) au grossissement (Gx4), (b) (Gx40) et la chaîne sporale (c) (Gx40)

La souche TC2

Le mycélium aérien de la souche **TC2** se présente sous forme de filaments très longs et fins non segmentés (siphonnés) **(b)**, portant une chaîne de spores linéaire. Ces dernières sont de formes rondes organisées en amas ou isolées et dispersées **(c)** en dehors du mycélium.

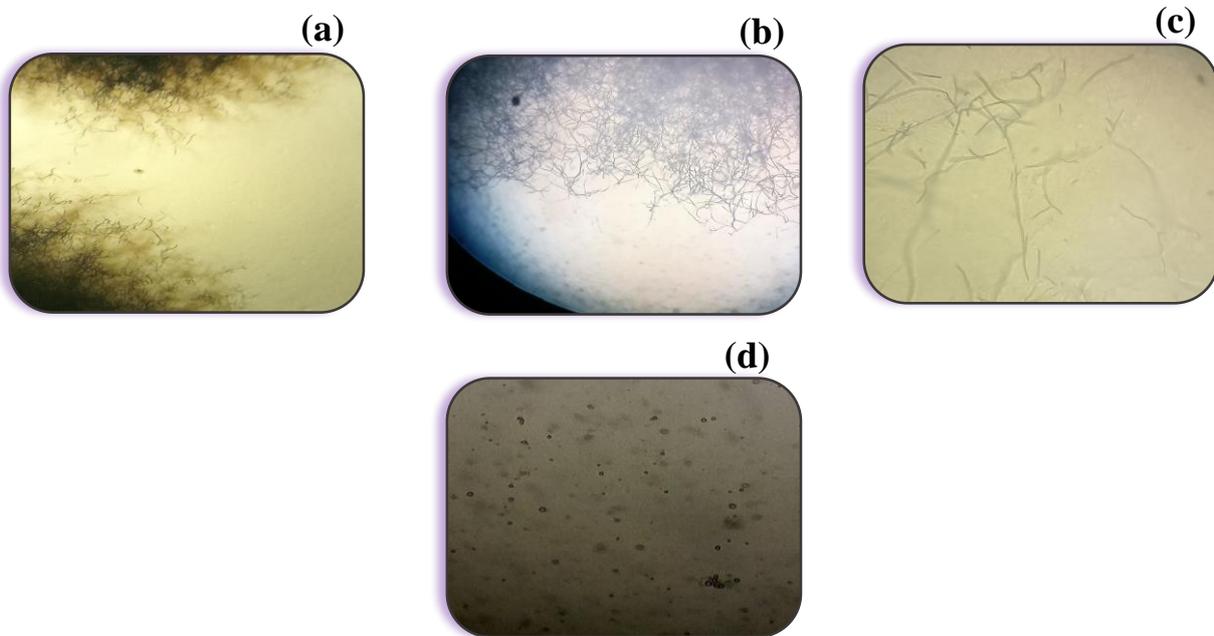


Figure 8 : Observation microscopique du mycélium aérien de la souche **TC2** ; **(a)** au grossissement (Gx4), **(b)** (Gx10), **(c)** (Gx40) et la forme des spores **(d)** (Gx40)

Sur la base des observations macroscopiques (croissance, aspect, et production de pigments) et microscopiques (chaîne de spores et la forme des hyphes) des deux isolats, il est possible de les apparenter au genre *Streptomyces*. En effet, les deux souches montrent des traits de ressemblance typiques à ce genre d'actinobactéries (**Bergey manuel, 2012**). D'après **Locci et al. (1989) cités par Thakur et al. (2007)** ; les souches présentant une croissance sur une large gamme de milieu de culture, montrent généralement une morphologie typique des *Streptomycètes*.

2 Caractères physiologiques des souches

2.1 Production de pigments mélanoïdes

Les isolats **TC1** et **TC2** présentent une bonne croissance sur le milieu ISP7. Aucun pigment n'est sécrété sur ce milieu.

Les pigments mélanoides sont des produits de la transformation de la Tyrosine en DOPA-mélanine responsable de la couleur, cette transformation est due à la présence de l'enzyme Tyrosinase (**Vasanthabharthi et al., 2011**). D'après cette étude les deux souches **TC1** et **TC2** ne produisent pas cette enzyme.

2.2 Dégradation de divers composés organiques

Les résultats obtenus des tests biochimiques sont résumés dans le tableau (V).

2.2.1 Les sucres

La mise en évidence de la dégradation des différents sucres testés montre que les isolats **TC1** et **TC2** assimilent la plupart de ces derniers. Les résultats de ce test sont représentés dans le tableau (V).

A la lumière de ces résultats, il a été constaté que les deux souches présentent une meilleure croissance sur les milieux contenant le mannose, le tryptose, fructose, galactose, xylose, glucose, cellobiose et arabinose. Tandis qu'une faible croissance a été observée sur le milieu contenant le rhamnose comme source de carbone. Par ailleurs, il a été noté que la présence du Lactose et du mellibiose dans le milieu influence négativement sur la croissance de la souche **TC2**, contrairement au résultat obtenu avec la souche **TC1**, où il a été remarqué une bonne croissance en présence de ces deux sources de carbone.

2.2.2 Les acides aminés

D'après les résultats obtenus, représentés dans le tableau (V), il est clairement remarquable que les deux souches **TC1** et **TC2**, se développent en présence de L. lysine et l'Acide glutamique avec une excellente croissance. Cependant les deux isolats ont une faible croissance voir absente sur les milieux contenant l'alanine, arginine, L.histidine, serine et dans la gélose témoin.

2.2.3 Activités enzymatiques

Les résultats des tests enzymatiques effectués sur les deux isolats (**TC1** et **TC2**) sont représentés dans le tableau (V). Ces résultats montrent que les deux souches sont capables de dégrader tous les substrats testés ce qui indique leur aptitude à produire des enzymes hydrolytiques.

Hydrolyse des protéines

Le résultat de ce test apparaît après une culture de 10 jours sur un milieu à base de lait écrémé, L'apparition d'une zone claire autour des colonies (**Figure 9**) indique la dégradation de cette protéine et la production de protéases par les deux souches (**TC1** et **TC2**).



Figure 9 : Hydrolyse de la caséine du lait par les deux souches **TC1** et **TC2**

En 2011, **Gulve** et **Deshmukh** ont montré dans leur étude sur les activités enzymatiques des actinobactéries que les genres *Streptomyces*, *Micromonospora*, *Nocardia* et *Saccharopolyspora* possèdent une activité protéolytique pour la dégradation de la caséine, ces résultats concordent avec ceux obtenus dans cette présente étude.

Hydrolyse de l'amidon

A partir du tableau V et la figure 10, il a été constaté que les deux souches présentent une activité amylolytique. Ce résultat est visualisé par l'apparition d'un halo clair autour des colonies indiquant ainsi la dégradation de l'amidon ce qui implique que les isolats étudiés produisent l'amylase.



Figure 10 : Hydrolyse de l'amidon par les deux souches **TC1** et **TC2**

Plusieurs études réalisées dans ce contexte prouvent que la majorité des actinobactéries possèdent ou bien synthétisent des amylases (Kuo et Hartman, 1966) ; (ChaoHsun et Wen-Hsiung, 2007).

✚ Hydrolyse de la cellulose

Le résultat du test de dégradation de la cellulose a montré que les deux isolats présentent une activité cellulasique sur le milieu CMC contenant la cellulose comme seule source de carbone et ceci est observé par l'apparition d'un halo clair autour des colonies (figure 11) indiquant ainsi la production de cellulase par ces souches.



Figure 11 : Hydrolyse de la cellulose par les deux souches TC1 et TC2

Une étude réalisée par Gobalakrishnana et al. 2016 a montré que la souche d'actinobactéries nommé MHA15 isolée de l'île Havelock des Andamans a présenté une forte activité cellulasique.

✚ Hydrolyse des lipides (tween 80)

Pour l'activité lipasique, qui se traduit par l'apparition d'une zone opaque autour des colonies comme le montrent les photographies présentées en figure 12, les résultats obtenus indiquent clairement que les deux souches sont capables de dégradés les lipides.



Figure 12 : Hydrolyse des lipides par les deux souches TC1 et TC2

Plusieurs travaux ont montré la grande capacité des actinobactéries à produire des lipases. A titre d'exemple **Rodrigues et al. 2022** ont menés une étude qui montre que deux souches d'actinobactéries, *Arthrobacter polychromogenes* et *Streptomyces violaceoruber*, sont de bonnes productrices de lipases. De plus l'étude réalisée en (2021) par **Welz et al.** a permis de constater que la production des enzymes lipolytiques est également retrouvée chez plusieurs souches d'actinobactéries.

En (2021) **Do et al.**, ont étudiés une souche de *Streptomyce* (*Streptomyces flavovariabilis* XM21) qui était capable de produire des enzymes extracellulaires, telle que les cellulase, protéase, l'amylase et lipase.

Tableau V : Caractérisation biochimiques des isolats étudiés

	Facteurs	variables	la croissance	
			TC1	TC2
Tests biochimiques	Sucres	Mannose	+++	+++
		Tryptose	+++	+++
		Galactose	+	+++
		Fructose	+++	+++
		Xylose	+	+++
		Glucose	+++	+
		Arabinose	+++	+++
		Fructose	+++	+++
		Rhamnose	+	±
		Lactose	+++	±
		Cellobiose	++	++
		Millibiose	+++	+
		Témoin	-	/
	Acides aminés	A. glutamique	++	+++
		L. histidine	+	-
		Serine	-	-
		L. lysine	+++	+++
		Alanine	-	±
		Arginine	±	±
		Témoin	-	/
	enzymes	Amidons	+	+
		Protéines	+	+
		Lipides	+	+
		Celluloses	+	+

Note : Croissance ou sporulation : +++ : bonne ; ++ : moyenne ; + : faible ; ± : très faible ; - : nulle ; / : Non déterminé.

2.2.4 Utilisation des sels de sodium

D'après les résultats illustrés sur la figure 13, il a été rapporté que les deux souches (TC1 et TC2) métabolisent les deux composés organiques (l'Acétate de sodium et l'Oxalate de sodium). La dégradation de ces derniers est traduite par l'apparition de la couleur rose dans le milieu.



Figure 13 : Dégradation des sels de sodium par les TC1 et TC2. A : Acétate de sodium ; B : Oxalate de sodium

2.3 Tests de sensibilité à divers agents physiques et chimiques

L'ensemble des résultats des tests de sensibilité aux agents physiques et chimiques sont représenté dans le tableau VIII.

2.3.1 Le potentiel d'hydrogène (pH)

Les résultats de ce test montrent que les deux souches se développent à des valeurs de pH allant de 5,2 à 11,2. Cependant une croissance plus au moins absente au pH 3.2 est constatée.

Communément, les acténobactéries préfèrent un pH neutre ou peu alcalin (Zvyagintsev et al., 2007). Alors nous pouvons dire que les deux souches sont alcalophiles.

2.3.2 La température

Les deux souches ont montré une meilleure croissance à une température de 28°C qui se traduit par un développement plus important du mycélium aérien (MA). Cette croissance est moins importante à 37°C et elle est totalement absente à 50°C. Il est important de signaler également que les isolats ont la capacité de se développer à des températures basses de l'ordre de 4°C.

D'après ces résultats, les deux souches se développent à des températures extrêmes (4°C), donc elles sont dites psychrophes (Fournaud, 1982 ; Catteau, 1999). Généralement, les actinobactéries sont mésophiles mais certaines espèces sont thermophiles (Belyagoubi, 2014).

2.3.3 Tolérance à différentes concentrations de NaCl

Les deux souches (TC1 et TC2) sont capables de se développer à des concentrations comprises entre 0,2M et 1,6M avec un optimum de croissance à des concentrations $\leq 0,6$ M de NaCl accompagné d'une production de pigments diffusibles par la souche TC1 (Figure 14).

Cependant un développement relativement moyen a été noté entre 1,4 et 1,6 M de NaCl et au-delà de ces concentrations les deux souches perdent de façon significative leur capacité de croître sur ce milieu.

D'après Kushner, 1987 cité par Tang et al, (2003), les actinobactéries peuvent être classées en plusieurs classes selon leur aptitude à croître en présence de NaCl (Tableau VII).

Tableau VII : Types de microorganismes halophiles (Kushner, 1987 cité par tang et al., 2003)

Microorganismes	concentration optimal (NaCl)
Non halophiles	$\leq 0,2$ mole/L ($\leq 1,77\%$)
Faiblement halophiles	0,2 - 0,5 mol/L (1,77 - 14,63%)
Modérément halophiles	0,5 - 2,5 mol/L (2,93 - 14,63%)
Halophiles extrêmes	2,5 - 5,2 mol/L (14,63 - 30,4%)
halotolérants	0,2 - 5,2 mol/L (1,77 à 14,63%)

Sur la base de cette classification, les deux souches peuvent être définies comme étant des actinobactéries halophiles modérées.

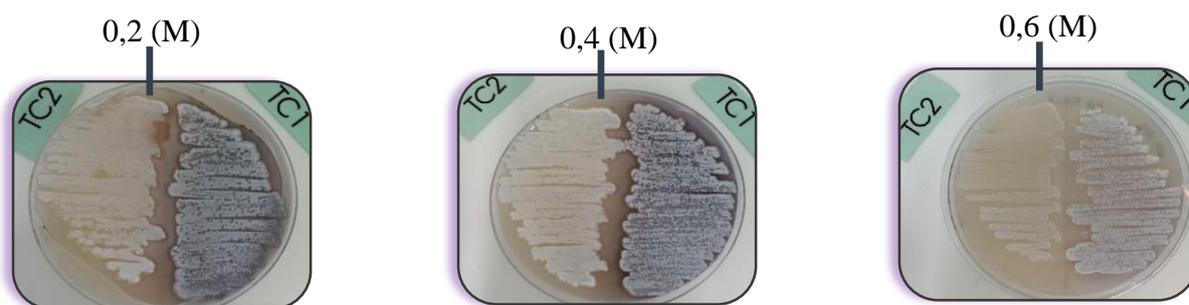


Figure 14 : Pigmentation de TC1 sur différentes concentrations de NaCl

Tableau VIII : Caractéristiques physiques et chimiques des souches TC1 et TC2

Agent physique	Facteurs	Variables	la croissance	
			TC1	TC2
Agent physique	Température (°C)	4	++	++
		28	+++	+++
		37	+++	++
		50	Absence de croissance	
Agents chimiques	NaCl (M)	0,2	+++	+++
		0,4	+++	+++
		0,6	+++	+++
		1	+++	+++
		1,2	+++	+++
		1,4	++	++
		1,6	±	±
		2	-	-
	2,5	-	-	
	pH	3,2	±	±
		5,2	+++	+++
		7,2	+++	+++
		9,2	++	+++
		11,2	+	+++

Note : Croissance ou sporulation : +++ : bonne ; ++ : moyenne ; + : faible ; ± : très faible ; - : nulle.

2.3.4 Mise en évidence de la résistance aux antibiotiques

Le profil de résistance des deux souches bactériennes TC1 et TC2 montre qu'elles sont résistantes à une multitude d'antibiotiques : Triméthoprime, Ampicilline, Amoxicilline, Céfotaxime, Acide Oxalinique, Colistine, Cefutoxime. Les résultats de l'antibiogramme sont illustrés dans la (figure 17) de l'Annex III.

Plusieurs travaux réalisés suggèrent que cette résistance est acquise par un changement du matériel génétique d'une bactérie, qui peut se produire par une mutation génétique (Wnorowski, 1993 ; Tewari et al., 2013).

En (2012) Mgbemena et al, ont démontrés qu'une corrélation existe entre la tolérance aux métaux lourds et la résistance aux antibiotiques chez les bactéries en raison de la probabilité que des gènes de résistance à la fois aux antibiotiques et aux métaux lourds, peuvent être étroitement situés sur le même plasmide. De nombreux travaux de recherches ont rapporté la relation de la résistance aux antibiotiques et aux métaux lourds chez les actinobactéries, à titre d'exemple en (2020) Yan et al ont constatés que les métaux libérés par l'activité minière peuvent déclencher la co-sélection de la résistance aux antibiotiques dans le phylum d'actinobactéries (Wu et al., 2015 ; Zhao et al., 2020 ; Yuan et al., 2019).

Ainsi une étude réalisée par Qiu et al en (2021) a montré après l'analyse des corrélations, des relations significatives entre l'abondance des GRA (gènes de résistance aux antibiotiques) et les métaux lourds, puisque les GRA suivants : *sul1*, *tetO* et *intI1* ont révélées des relations significatives avec Cu, Zn et Pb.

3 Mise en évidence de l'activité antagoniste

3.1 Activité antibactérienne

La souche TC1

Il a été remarqué que la souche cultivée pendant 7 jours sur un milieu en présence du métal (SCA + Zinc), présente qu'une seule activité contre *Staphylococcus aureus*, dont la zone d'inhibition est 7.66mm. Tant dis qu'en absence du métal, elle présente une activité relativement significative aussi bien vis-à-vis de bactéries à Gram-négatif (*Pseudomonas aeruginosa*) avec un diamètre de la zone d'inhibition 16mm, et encore bactéries à Gram-positif. Les résultats sont illustrés dans la figure 15.

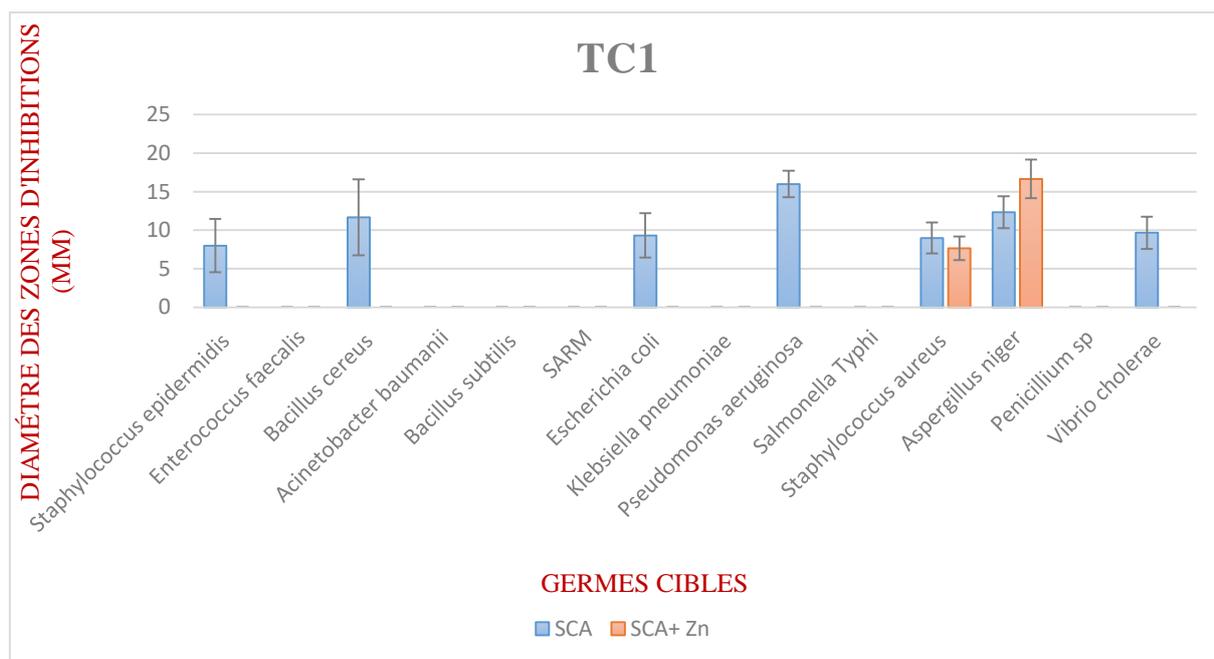


Figure 15 : Activité antimicrobiennes de la souche **TC1** en présence et en absence du Zinc à l'égard des germes cible

D'après les résultats obtenus nous pouvons déduire que la présence du Zinc (Zn) dans le milieu inhibe la synthèse de la substance bioactive, en jouant le rôle de répresseur.

La souche TC2

L'isolat obtenu sur le milieu contenant du Plomb présente une activité importante vis-à-vis de la plus part des germes testés, qui varie de 7mm à 13,3mm. D'autre part une activité moins importante a été observée vis-à-vis les germes à Gram positif notamment *Staphylococcus aureus* et *Bacillus cereus*, en absence du Pb dans le milieu de culture de la souche. Une seule activité bactériostatique contre *Pseudomonas aeruginosa* a été enregistrée (**figure 16**).

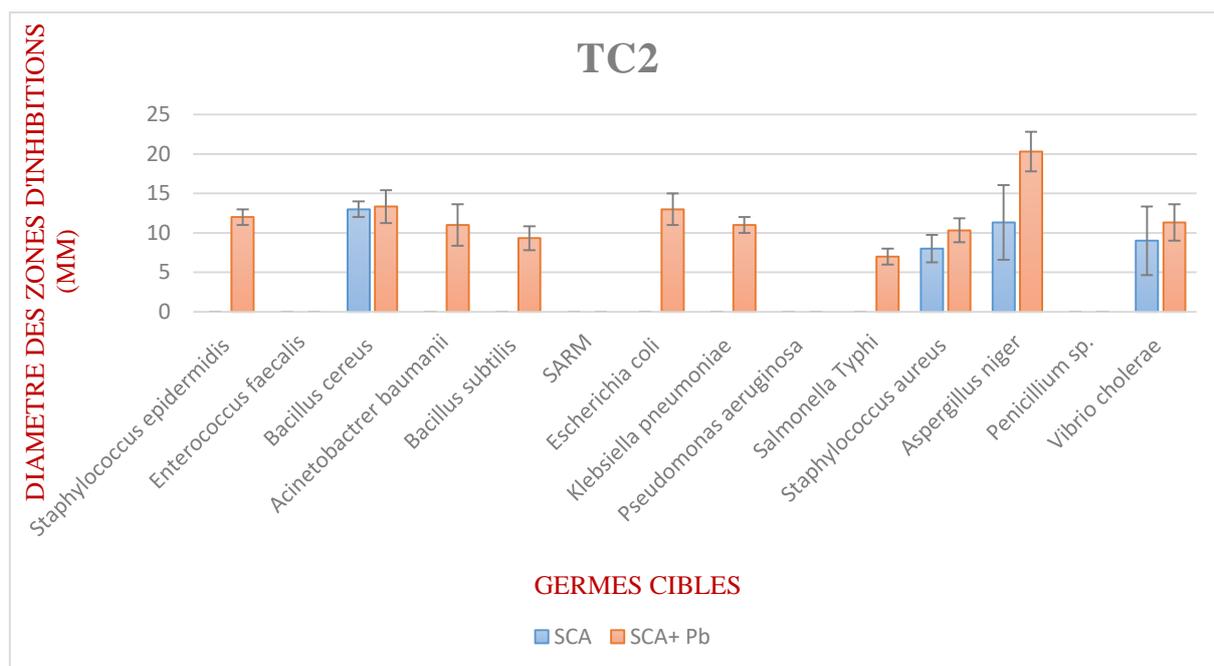


Figure 16 : Activité antimicrobiennes de la souche **TC2** en présence et absence du Plomb à l'égard des germes cible

Après l'analyse des résultats nous pouvons suggérer une hypothèse que le Plomb (Pb) joue un rôle d'un inducteur dans la synthèse de la molécule bioactive.

3.2 Activité antifongique

Les deux souches **TC1** et **TC2** ne présente aucune activité antagoniste vis-à-vis de *Penicillium* sp, par contre une activité plus importante a été observée à l'encontre *Aspergillus niger* avec des zones d'inhibition variables selon la souche testée et le milieu utilisé soit en présence de métal ou en absence de ce dernier. Les résultats de l'activité antifongique sont rapportés dans les figures 15 et 16 ci-dessus et figure 18 de l'Annexe III.

En présence du métal des zones d'inhibition assez importante ont été observés allons de 16,6mm à 20,3mm chez les deux souches **TC1** et **TC2** respectivement. En revanche en absence du métal une zone d'inhibition, moins importante ont été observées, 12,3 mm et 9,3mm de diamètre pour **TC1** et **TC2** respectivement.

Conclusion

L'étude réalisée au sein du Laboratoire de Microbiologie Appliquée (LMA) et du Laboratoire Génie Biologique de l'Université de Bejaia, a porté sur la caractérisation de deux souches d'actinobactéries (**TC1** et **TC2**) résistantes aux métaux lourds essentiellement Zinc et Plomb.

Nous nous sommes intéressé dans ce travail aux aspects phénotypiques (macromorphologiques et micro- morphologiques) et culturels des deux souches sur différents milieux de cultures et la production de pigment mélanoides.

Les résultats des tests phénotypiques (culturels et micro-morphologiques) montrent que les deux souches peuvent rattachées au genre *Streptomyces*. En effet leur capacité à croître sur les différents milieux testés et l'aspect du mycélium et des chaînes sporales sous microscope, laisse supposer que ces souches (**TC1** et **TC2**) appartiennent à ce genre d'actinobactéries.

D'autre part, les résultats des tests biochimiques, permettent de constater que les deux souches ont la capacité d'utiliser la majorité des composés organiques comme seule source de carbone, comme elles sont capables d'utiliser certains acides aminés (Acide glutamique et L.lysine) comme seule source d'azote pour la synthèse des métabolites essentiels à leur croissance.

L'étude enzymatique a révélé le pouvoir des souches étudiées à hydrolyser plusieurs substrats ce qui nous renseigne sur l'activité enzymatique importante de ces dernières.

Les résultats de l'étude physiologique ont permis de connaître certains caractères de cultures pouvant être utilisés pour la sélection.

Les résultats de test résistance aux antibiotiques réalisé sur les deux souches étudiées révèlent qu'elles résistent aux antibiotiques appartenant aux familles des bêta-lactamines, diaminopyrimidine, polymyxines et quinolone. Ces résultats sont cohérents vu la capacité des souches à synthétiser des molécules bioactives inhibitrice de certains germes cibles (bactéries Gram+, bactéries Gram-, champignons). La résistance des souches à ces antibiotiques sous-entend leurs aptitudes à la production de ces molécules.

Il serait intéressant d'aborder les points suivants dans l'avenir afin d'affiner ce présent travail :

- Etude de la résistance des souches aux métaux lourds étudiés en culture liquide.
- La caractérisation moléculaire de ces souches.

- La détermination et la caractérisation des mécanismes impliqués dans la résistance aux métaux lourds par l'utilisation des techniques de biologie moléculaire.
- Application des souches testées en bioremédiation des biotopes pollués par les métaux lourds.
- La réalisation des tests complémentaires (activité antivirales, activité antioxydante...).

Références bibliographiques

Références Bibliographiques

A

- Aburas M.M.A. (2016). Bioremediation of toxic heavy metals by waste water Actinomycetes. *Int. J. Curr. Res.* 8 (01), 24870-24875.
- Albarracín V.H., Amoroso M.J., Abate C.M. (2005). Isolation and characterization of indigenous copper-resistant actinomycete strains. *Chem. Erde* 65 (S1), 145-156.
- Amoroso M.J., Castro G.R., Carlino F.J., Romero N.C., Hill R.T., Oliver G. (1998). Screening of heavy metal-tolerant actinomycetes isolated from the Salí River. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 44, 129-132.
- Anandan R., Dharumadurai D., Manogaran G.P. (2016). An Introduction to Actinobacteria. In: Dhanasekaran D., Jiang Y. (eds) *Actinobacteria: Basics and Biotechnological Applications*. Intech, Rijeka, Pp.3-37.
- Andriambololona T. (2010). Etudes biologiques et chimiques des métabolites secondaires des actinomycètes telluriques cas de la forêt d'Ankafobe. Thèse Maîtrèes-Sciences. Université d'Antananarivo-Madagascar, Faculté des sciences, 6p.
- Ao-Amer A. E., Abu-Gharbia M. A., Soltan E. S. M. et Abd El-Raheem W. M. (2013). Isolation and molecular characterization of heavy metal resistant *Azotobacter chroococcum* from agricultural soil and their potential application in bioremediation.

B

- Badji B. (2006). Etude de la taxonomie et des antibiotiques antifongiques de trois souches d'actinomycètes d'origine saharienne appartenant aux genres *Actinomadura* et *Nonomurea*. Thèse de Doctorat. Université Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou, c ; p 226.
- Baize D. (1997). Teneurs totales en éléments traces métalliques dans les sols (France). INRA Editions, Paris, p 408.
- Baker A.J.M., and Walker P.L. (1990). Ecophysiology of metal uptake by tolerant plants. In: Shaw, J. (Ed.). *Heavy Metal Tolerance in plants: Evolutionary aspects*. CRC Press, Boca Raton, Florida, 155-178.
- Bankar A and Nagaraja G. (2018). Recent Trends in Biosorption of Heavy Metals by Actinobacteria.

Références Bibliographiques

- Bastide A., de Méo M., Andriantsoa M., Laget M., Duménil G. (1986). Isolement et sélection de souches d'actinomycète tes productrices de substances antifongiques de structure non-polyéniques. *Mircen. J* ; 2, p. 453-466.
- Belyagoubi L. (2014). Antibiotiques produits par des bactéries (actinomycètes et bactéries lactiques) issus de différents écosystèmes naturels algériens. Thèse de Doctorat. Université Aboubakr Belkaïd-Tlemcen. P : 14-17.
- Benaouida K. (2008). Etude de l'alpha amylase de levures isolées d'un écosystème extrême (sol environnant des sources thermales) et cultivées sur un milieu à base de lactosérum. Mémoire Magistère. Université Mentouri. Constantine. 104p.
- Benmalek Y., Halouane A and Hacene H. (2014). Resistance to heavy metals and bioaccumulation of lead and zinc by *Chryseobacterium solincola* strain 1YB-R12T isolated from soil.
- Benson D.R. (1993). Silvester W.B. Biology of Frankia strain, actinomycetes symbiont of actinorrhizal plants. *MicrobiologicalReviews*, (1993); 57:293-319.

C

- Canada. (2016). Qualité de l'eau - Rapports et publications. Retrieved July 2, 2017, from <https://www.canada.ca/fr/sante-canada/services/sante-environnement-milieu/travail/rapports-publications/qualite-eau.html>
- Catteau M. (1999) : Pathogènes rencontrés lors de la conservation par le froid. In : La Microbiologie prévisionnelle appliquée à la conservation des aliments réfrigérés, 333 pages, Office des publications officielles des Communautés européennes Editeur, Luxembourg.
- Chiffolleau et al., (2001). Evaluation des concentrations des quarte métaux lourds (Pb, Cd, Cu, Zn) chez le Mulet (*Mugil cephalus* Linné 1758) pêché dans des baies d'Oran et de Béni saf.
- Cimino. G, Cappello R. M, C. Caristi and Toscano G, *Chemosphere*, 61 (2005) 947.
- Colombié V. (2005). Description de la production de spiramycine par *Streptomyces ambofaciens*. Modélisation métabolique, simulation et capteur logiciel. Thèse de Doctorat. Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse. Pp174.

Références Bibliographiques

D

- Daboor S. M., Haroon A.M., Neven A E E., Hanona S I. (2016). Heavy metal adsorption of *Streptomyces chromofuscus*.
- De Abreu C.A., de Abreu M.F., Andrade J.C. (1998). Distribution of lead in the soil profil evaluated by DTPA and Mehlich-3 solution. *Bragantia* 57, 185-882.
- De Vos P., Garrity G. M., Jones D., Krieg N. R., Ludwig W., Rainey F. A., Schleifer K. H. and Whitman W. (2009). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd Ed., The Firmicute. Springer. New York. Vol. 3. 63-67.
- Dgigal D. (2003). Interaction entre la communauté microbienne du sol (bactéries et champignons mycorhiziens) et les nématodes bactérivores : effet sur la nutrition minérale et la croissance de différentes plantes. Thèse de doctorat : université Cheikh Anta Diop De Dakar. Pp. 157.
- Djinni I., Djoudi W. (2021). *Streptomyces* sp. WR1L1S8 a potent endophytic marine strain for heavy metal resistance and copper removal enhanced by RSM modeling. Université de Bejaia, Algeria.
- Do T.T., Le V.T., Ngo C.C., Do T.T.H, and Dang T.H.P. (2021). Biological characteristics and classification of thermophilic actinomycetes showed extracellular hydrolytic enzymes producing ability isolated from compost.

E

- El Baz S., Baz M, Barakate M., Hassani L., El Gharmali A, and Imziln B. (2014). Resistance to and Accumulation of Heavy Metals by Actinobacteria Isolated from Abandoned Mining Areas.
- Ensign J. C., Normand p., Burden J. P., Yallop C. A. (1993). Physiology of some actinomycetes genera. *Rev. Microbiol.* 144, p. 657-660.
- Eunice J.A., Prosser J.I. Mycelial growth and branching of *Streptomyces coelicolor* A3 (2) on solid medium. *Journal of geneticmicrobiology*, (1983); 129: 2029-2036.

Références Bibliographiques

F

- Fournaud J. (1982) : Type de germes rencontrés aux différents stades de la filière. In : Hygiène et technologie de la viande fraîche, 353 pages, Centre national de la recherche scientifique Editeur, Paris.

G

- Gadd G. M. (1992). Metals and microorganisms: A problem definition. FEMS Microb. Letter, 100 :197-204.
- Gaur.R and Tiwari.S. (2015) Isolation, production, purification and characterization
- Gavrilescu M. (2004). Removal of Heavy Metals from the environment by biosorption. Engineering in Life Sciences. 4(3) : 219-232.
- Gelabert A., Pokrovsky O., Viers J., Schott J., Boudou A., Feurtet- A. (2006). Interaction between zinc and freshwater and marinediatom species: Surface complexation and Zn isotope fractionation. Geochimic Cosmochimic. Acta., 70: 839-857.
- Goodfellow M. (2012). Phylum XXVI.Actinobacteria phyl.nov. In: Goodfellow et al, (Editors) Bergey Manuel of Systematic Bacteriology, The Actinobacterisecondedition, vol. V, part A, New York, Dordrecht, Heidelberg, London. Pp. 1-28.
- Goodfellow M. (2012). Phylum XXVI.Actinobacteria phyl.nov. In: Goodfellow et al. (Editors). Bergey Manuel of Systematic Bacteriology, The Actinobacteria, second edition, vol. V, part A, New York, Dordrecht, Heidelberg, London. Pp. 1455–1616.
- Goodfellow M., Williams S. T. (1983). Ecology of actinomycetes. Annuals Review of Microbiology, 37, p. 189-216.
- Gordon R.E., Barnett D.A., Handarhan J.E.,and Hor-Nay-Pang. C. (1974). - Nocardia coeliaca, Nocardia autotrophica and the nocardin strains. Int. J. Syst. Bacteriol., 24, 54-63.
- Gulve R. M. and Deshmukh A. M. (2011) Enzymatic activity of Actinomycetes isolated from marine sediments. Recent Research in Science and Technology, 3(5): 80-83.
- Guo, J.K., Lin, Y.B., Zhao, M.L., Sun, R., Wang, T.T., Tang, M., et al., 2009. Streptomyces plumbiresistens sp. nov., a lead resistant actinomycete isolated from lead-polluted soil in north-west China. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 59, 1326-1330. Of an organic-solvent thermostable alkalophilic cellulase from Bacillus vallismortis RG-07. BMC Biotechnology. Vol.15 n°19.2 - 12.

Références Bibliographiques

H

- Hamed J., Dehhaghi M., Mohammadian F. (2015). Isolation of extremely heavy metal resistant strains of rare actinomycetes from high metal content soils in Iran. *Int. J. Environ. Res.* 9 (2), 475-480.
- Hashida M., Semerok A, Gobert O, Petite G., Izawa Y., Wanger J.F. (2002). Ablation threshold dependence on pulse duration for copper. *Appl. Surf.Sci.*, 197-198.
- Heb Cristyni Santa Rosa Rodrigues., Andrea Limoeiro Carvalho., Leonaiara Mariano Santos., Andreza Borba da Silva., Marcelo Andrés Umsza-Guez. (2021). Actinobacteria hydrolase producer solid-state fermentation using licuri. *Actinobactéria produtora de hidrolase em fermentação em estado sólido com licuri.*

I

- I. H. C, eribasi and U. Yetis. (2001). "Biosorption of Ni (ii) and Pb (ii) by *Phanerochaete chrysosporium* from a binary metal system kinetics," *Water SA*, vol. 27, no. 1, pp. 15–20.

J

- Janssen J., Weyens N., Croes S., Beckers B., Meiresonne L., Van Peteghem P., Vangronsveld J. (2015). Phytoremediation of Metal Contaminated Soil Using Willow: Exploiting Plant-Associated Bacteria to Improve Biomass Production and Metal Uptake. *International Journal of Phytoremediation*, 17(11), 1123–36. <http://doi.org/10.1080/15226514.2015.1045129>
- Juwarkar A. A. et Yadav S. K. (2010). Bioaccumulation and biotransformation of heavy metals. In: *Bioremediation Technology Recent Advances* (ed) Fulekar M. H. India. p 266- 284.

K

À partir d'écosystèmes extrêmes. Identification moléculaire des souches actives et Caractérisation préliminaire des substances élaborées. Thèse de Doctorat. Université

Références Bibliographiques

- Kabata-Pendias, A. and Pendias, H. (2001). Trace elements in soils and plants. CRC Press, London.
- Kim T. K., Hewavitharana A.K., Shaw P.N. et Fuerest J.A. (2006). Discovery of new source of rifamycin antibiotics in marine sponge actinobacteria by phylogenetic prediction. *Appl Environ Microbiol*, 72, p. 2118-2125.
- Kitouni M. (2007). Isolement de bactéries actinomycétales productrices d'antibiotique
- Kumar A.G., Nag esh N., Prabhakar T.G., Sekaran G., (2008): Purification of extracellular acid protease and analysis of fermentation metabolites by *Synergistes* sp. Utilizing proteinaceous solid waste from tanneries. *Bioresour. Technol.* 99: 2364–2372p.
- Kuo & Hartman, M. P. (1966). Isolation of amylolytic strains of *Thermo-actinomyces-thermoactinomyces candidus*, a new species of thermophilic actinomycètes. *International vulgaris* and production of thermophilic actinomycete amylases, *J. Bacteriol* (Vol. 92). Mentouri- Constantine, Faculté des sciences de la nature et de la vie, 6p.

L

- Lakshmipathy D., Krishnan K. (2010). Biosurfactant and heavy metal resistance activity of *Streptomyces* spp. isolated from Saltpan Soil. *Br. J. Pharmacol. Toxicol.* 1 (1), 33-39.
- Lamari L. (2006). Production de nouveaux antibiotiques du groupe des pyrrothines par une nouvelle espèce d'actinomycète, *Saccharothrix algeriensis*. Thèse de Doctorat. Université Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou.
- Larpent J.P., Sanglier J.J. (1989). *Biotechnologies des antibiotiques*. Masson. Paris, pp. 481.
- Lengeler JW, Drews G, Schlegel HG (1999) *Biology of the prokaryotes*. Blackwell Science, New York.
- Liu C., Mao X.L., Mao S.S., Zeng X., Greilf R., Russo R.E. (2004). Nanosecond and femtosecond laser ablation of brass: Particulate and ICPMS measurements. *Anal. Chem.*, 76: 379-383.
- Locci R., & Shofied G.M. (1989). Genus *Streptoverticillium* Baldacci 1958, 15, emend. mut. char. Baldacci, farina and locci., 1966, 168 AL. In *Bergey's Manual of*

Références Bibliographiques

systematic Bacteriology, 4, 2492-2504. Edited by S. T. Williams, M.E. Sharpe & J.G. Holt. Baltimore : Williams & Wilkins.

- Loué, A. (1993). Oligo-éléments en agriculture. Ed. Nathan (ed), 45-177.

M

- Marchal N., Bourdon J.L., and Richard. Cl. (1987). - Les milieux de culture pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries. Doin editor. Paris, pp. 67-122.
- Masciandaro G., Macci C., Peruzzi E., Ceccanti B., & Doni, S. (2013). Organic matter –microorganism – plant in soil bioremediation: a synergic approach, 399–419. <http://doi.org/10.1007/s11157-013-9313-3>
- McLaughlin M. J., Parker D. R. & Clarke J. M. (1999). Metals and micronutrients – food safety issues. *Field Crops Res* 60, 143–163.
- Mergeay M., Nies, D., Schlegel H.G., Gerits J., Charles, P., and Van Gijsegem, (1985) *Alcaligenes eutrophus* CH34 is a facultative chemolithotroph with plasmid-bound resistance to heavy metals. *J Bacteriol* 162: 328-334.
- Mgbemena LC., Nnokwe J.C., Adjeroh L.A. et Onyemekara N.N. (2012). Resistance of Bacteria Isolated from Otamiri River to Heavy Metals and Some Selected Antibiotics. *Current Research Journal of Biological Sciences*, Vol 4(5), 551-556.

N

- Nabir, N.A.A.B.R.P., Office of Biological and Environmental Research, Office of Science, U.S. Department of Energy. What is Bioremediation. 2003 : p. 9.
- Nakajima A. ET Sakaguchi T. (1986). Selective accumulation of heavy metals by microorganisms. *Applied Microbiology Biotechnol.* 24 :59-64.

O

- Ojuederie OB, Babalola OO. (2017). Microbial and plant-assisted bioremediation of heavy metal polluted environments: a review. *Int J Environ Res Public Health* 14:1504–1511.
- OMS. (2016). Intoxication au plomb et santé. Centre Des Médias - Aide-Mémoire, 379. Retrieved from. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs379/fr>
- Oskay M., Tamer A., Azeri C. (2004). Antibacterial activity of some actinomycetes isolated from farming soils of Turkey. *Afr. J. Biotechnol.* 3, 441–446.

Références Bibliographiques

P

- Parungao M.M., Maceda E.B.G et Villano M.A.F. (2007). Screening of Actinomycetes from marine. Producing Actinomycetes from marine, Brackish and Terrestrial sediments of Samal Island, Philippines. Journal of research in science, Computing and Engineering, (2007) ; 4, 3, p. 29-38.
- Peraud O. (2006). Isolation and characterization of a sponge-associated actinomycete that produces manzamines. Dissertation submitted to the Faculty of Graduate School of the University of Maryland.
- Polti, M.A., Aparicio, J.D., Benimeli, C.S., Amoroso, M.J., 2014. Simultaneous bioremediation of Cr (VI) and lindane in soil by actinobacteria. Int. Biodeterior. Biodegrad. 88, 48-55.
- Prescott L. F., Harley J. P & Klein D. A. (1995). *Microbiologie*. Bruxelles: DeBoeck Université.
- Prescott L.M., Harley J.P., Klein D.A. (2003). *Microbiologie*, 2^e édition de Boeck, Bruxelles. Pp 546.

Q

- Qiu Z., Zhou G., Wang H., Wu X. (2021). The behavior of antibiotic-resistance genes and their relationships with the bacterial community and heavy metals during sewage sludge composting.

R

- R. Garnier. (2005). Toxicité du plomb et de ses dérivés, EMC (Elsevier Masson SAS) Pathologie Professionnelle et de l'Environnement, p. 67-88.
- Rajagopal G., Kannan S. (2016). Systematic characterization of potential cellulolytic marine actinobacteria *Actinoalloteichus* sp. MHA15.
- Ranjani A., Dhanasekaran D., Gopinath P. (2016). An introduction to Actinobacteria. *Actinobacteria-Basics and Biotechnological Applications*.
- Richards J.W., Glenn D Krumholz M., Chval S., Tisa L.S. (2002). Heavy metal resistance patterns of *Frankia* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 68 (2), 923-927.

Références Bibliographiques

- Robert M., Juste C. (1999). Enjeux environnementaux et industriels -Dynamique des éléments traces dans l'écosystème sol. In : Spéciation des métaux dans le sol. Les Cahiers du Club Crin, Paris, pp. 15-37.

S

- S. El Baz, Bioremediation of heavy metals by actinobacteria: review, Am. J. innov. Res. Appl. Sci. 5 (2017) 359–369.
- Sabaou N. (1988). Contribution à l'étude des sols des palmerais algérienne. Systématique et écologie. Thèse de Doctorat Es Science Naturelles, option Microbiologie, USTHB, Alger, pp. 65-68.
- Sanglier J.J., Haag H., Huck T.A., Fehr T. (1993). Novel bioactive compound from Actinomycetes: a short review (1988-1992). *Res. Microbiol.*, 144 (8), 633-642.
- Schmidt A., Aferburg G., Sineriz M., Merten D., B'uchel G., Kothe E., (2005). Heavy metal resistance mechanisms in actinobacteria for survival in AMD contaminated soils. *Chem. Erde-Geochem.* 65 (1), 131-144.
- Shirling. E.B; and Gottlieb. D. (1966). - Methods for characterization of Streptomyces species. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 16 (3), 313-340.
- Sierra G.A. (1957): A simple method for the detection of lypolytic activity of microorganisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substracts. *Antonine van Leeuwenhoeck.* 28: 15-22p.
- Singh S., Pandey S., Chaudhary H.S. (2014). Actinomycetes: Tolerance against heavy metals and antibiotics. *Int. J. Bioassays* 3 (10), 3376-3383.
- Singh S.N. et Tripathi R.D. (2007). *Environmental Bioremediation Technologies.* Springer édition, New York, 2-4.
- Singh Y., Ramteke P. W., Tripathy A. et Shukla P. K. (2013). Isolation and characterization of *Bacillus* resistant to multiple heavy metals. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences.* 2 (11) : 525-530.
- Stach, J. E., Bull A. T., Ward, A. C., & Goodfellow, M. (2005). Marine actinobacteria: perspective, challenges, future directions. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 87(1), 65-79.
- Stefanowicz, A.M., Kapusta, P., Zubek, S., Stanek, M., Woch, M.W. (2020). Soil organic matter prevails over heavy metal pollution and vegetation as a factor shaping soil microbial communities at historical Zn-Pb mining sites. *Chemosphere* 240, 124922.

Références Bibliographiques

- Sterckeman, T., Douay, F., Proix, N., Fourier, H. (2000). Vertical distribution of Cd, Pb and Zn in soils near smelters in the North of France. *Environmental Pollution* 107, 377-389.
- St-Onge L., Kwong E., Sabsabi M., Vadas E.B. (2002). Quantitative analysis of pharmaceutical products by laser-induced breakdown spectroscopy.
- Sunil K.C.R., Swati K., Bhavya G., Nandhini M., Veedashree M., Prakash H.S., et al., (2015). *Streptomyces flavomacrosporus*, a multi-metal tolerant potential bioremediation candidate isolated from paddy field irrigated with industrial effluents. *Int. J. Life Sci.* 3 (1), 9-15.

T

- Tang S. K ; Li. W. J ; Dong. W; Zhang Y. G; Xu. L; and Jiang. C. L. (2003). Studies of the biological characteristics of some halophilic and halotolerant Référe Actinomycetes isolated from saline and alkaline soils. *Actinomycetologica*, 17 (1), 06 10
- Tewari S., Ramteke P.W., Tripathi M., Kumar S. et Garg S.K. (2013). Plasmid mediated transfer of antibiotic resistance and heavy metal tolerance in thermotolerant water borne coliforms. *African Journal of Microbiology Research*. Vol. 7(2), 130-136.
- Thakur D., Yadav A., Gogoi B.K., Bora T.C. (2007). Isolation and screening of *Streptomyces* in soil), of protected forest areas from the states of Assam and Tripura, India, for antimicrobial metabolites., *Journal de Mycologie et Médecine.*, 17(4), 242-249.
- Timková I, Sedláková-Kaduková J., Pristaš P. (2018). Biosorption and bioaccumulation abilities of Actinomycetes/*Streptomyces* isolated from metal contaminated sites, *Separations* 5 (2018) 54.

V

- Verma V.C., Gond S.K., Kumar A., Mishra A., Kharwar R. N and Gange A. C. (2009). Endophylitic Actinomycetes from *Azadirachta indica* A. Jus: Isolation, Diversity, and Anti-Microbiol activity. *Microbiology Ecology*, 57 : 749-756.
- Vinod K., Jaiprakash C., Thamizhmani R., Vimal Raj R., Lall C., Muruganandam N., et al., (2014). High metal resistance and metal removal properties of antibiotics

Références Bibliographiques

producing Actinobacteria isolated from rhizosphere region of *Casuarina equisetifolia*.
Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci. 3, 803-811.

W

- Weyland H. (1986). Actinomycètes of the bottom sediments of various seas. GERBAM-Deuxième Colloque International de bactériologie marine. CNRS, Brest, 1-5 October 1984 IFREMER, actes de Colloques, 3, p. 73-79.
- Williams S.T., Goodfellow M.; and Alderson G. (1989). – Genus *Streptomyces* Waksman and Henrici. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology., Williams S.T., Sharpe M.E. and Holt J.G. (Eds.), Volume 4. Williams and Wilkins Co., Baltimore, pp. 2452-2492.
- Wnorowski A.U. (1993). Resistance to antibiotics of heavy metal-tolerant and heavy metal-sensitive bacterial strains. Journal of Environmental Science and Health, Vol 28(1), 203-215.
- Wu D., Huang Z.T., Yang K., Graham D., Xie, B. (2015). Relationships between antibiotics and antibiotic resistance gene levels in municipal solid waste leachates in Shanghai, China. Environ. Sci. Technol. 49, 4122–4128.

Y

- Yan C., Wang F., Liu H., Liu H., Pu S., Lin F., Geng H., Ma S., Zhang Y., Tian Z., Chen H., Zhou B., Yuan R. (2020). Deciphering the toxic effects of metals in gold mining area: Microbial community tolerance mechanism and change of antibiotic resistance genes.
- Yang CH., Liu WH., L.Y. (2007). Cloning and characterization of a maltotriose-producing α -amylase gene from *Thermobifida fusca*. Journal of Microbiology and Biotechnology, (Vol. 34).
- Yuan, L., Li, H.Z., Zhang, M.Q., Shao, W., Fan, Y.Y., Sheng, G.P. (2019). Mercury/silver resistance genes and their association with antibiotic resistance genes and microbial community in a municipal wastewater treatment plant. Sci. Total Environ. 657, 1014–1022.
- Yun BR., Malik A., Kim SB. (2020). Genome based characterization of *Kitasatospora* sp. MMS16-BH015, a multiple heavy metal resistant soil actinobacterium with high

Références Bibliographiques

antimicrobial potential. Department of Microbiology and Molecular Biology. Republic of Korea, 4p.

Z

- Zaitlin B., Watson SB. (2006). Actinomycetes in relation to taste and odour in drinking water: Myths, tenets and truths. *Water.Res.* 40, 1741-1753.
- Zermane F. (2007). Etude des caractéristiques culturelles des actinomycètes impliquées dans la biodégradation de la cellulose, des substances pectiques et des composés organiques de synthèse. Thèse de doctorat. Université Toulouse. France, pp : 33-38.
- Zhao J., Han L., Yu M., Cao P., Li D., Guo X., Liu Y., Wang X., and Xiang W. (2019). Characterization of *Streptomyces sporangiiformans* sp.nov. A Novel Soil Actinomycete with Antibacteria Activity against *Ralstonia solanacearum*.
- Zvyagintsev D.G., Zenova G.M., Doroshenko E.A., Gryadunova A.A., Gracheva. T.A. and Sudnitsyn. I.I. (2007). - Actinomycete Growth in Conditions of Low Moisture. *Biology Bulletin*, Vol. 34 (3), 242–247.

ANNEXES

ANNEXE I

Matériel utilisé durant le travail expérimental

- Anse de platine
- Autoclave « Avantage- Lab AL02-12 »
- Bain-Marie « GFL »
- Barreaux magnétiques
- Balance « ADAM AFA- 120LC »
- Bec bunsen
- Béchers
- Boîte de Petri de 99 mm
- Boîte de Petri de 57 mm
- Ecouvillons
- Entonnoir
- Eprouvette
- Embouts stériles
- Erlenmeyers
- Etuve bactériologique à 28 C°, 37C°, 50C° « BINDER »
- Flacons
- Micropipettes de 100 µL et 1000 µL.
- Microscope optique « euromex »
- Pipette Pasteur
- pH mètre « HANNA»
- Plaque agitatrice et chauffante « VELP Scientifica »
- Spatules
- Tube à essais
- Vortex « technoKartell TK3S »

ANNEXE II

MILIEUX D'IDENTIFICATION

Etude morphologique

Les milieux ISP ont été préconisés lors de l'« International Streptomyces Project » (**Shirling et Gottlieb, 1966**).

✚ Milieu ISP1

Tryptone : 5 g ; Extrait de levure : 3 g ; Agar : 15 g Eau distillée : 1000 ml. pH = 7,2.

✚ Milieu ISP2

Glucose : 4 g ; Extrait de levure : 4 g Extrait de malt : 10 g ; Eau distillée : 1000 ml ; Agar : 20 g ; pH 7,2.

✚ Milieu ISP3

Farine d'avoine : 20 g ; Solution saline standard 1 ml ; Agar : 20 g ; eau distillé : 1000 ml. pH 7,2.

✚ Solution saline standard : $\text{FeSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$: 0,1 g ; $\text{MnCl}_2, 4\text{H}_2\text{O}$: 0,1 g ; $\text{ZnSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$: 0.1 g ; eau distillée : 100 ml.

✚ Milieu ISP4

Amidon : 10 g ; K_2HPO_4 : 1 g ; $\text{MgSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$: 1 g ; NaCl : 1 g ; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$: 2 g ; CaCO_3 : 2 g ; Solution saline standard (voir ISP3) : 1 ml ; agar : 20 g ; eau distillée : 1000 ml. pH 7,2.

✚ Milieu ISP5

L'Asparagine : 1 g ; Glycérol : 10 ; K_2HPO_4 : 1 g ; Solution saline standard : 1ml ; Agar : 20 g ; eau distillée : 1000ml. pH 7.

✚ SCA (Starch Casein Agar) (**Kuster et Williams, 1964**).

Amidon : 10 g ; Caséine : 0.3 g ; KNO_3 : 2 g ; K_2HPO_4 : 2 g ; NaCl : 2 g ; $\text{MgSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$: 0.05 g ; CaCO_3 : 0.02 g ; $\text{FeSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$: 0.01 g ; Agar : 18 g ; eau distillée : 1000 mL. pH 7.2.

Etude physiologique

1. Dégradation des glucides et dérivés

✚ Production de pigments mélanoides sur milieu ISP7 (**Shirling et Gottlieb, 1966**).

Glycérol : 15 g ; L-Tyrosine : 0,5 g ; L-Asparagine : 1 g ; K_2HPO_4 : 0,5 g ; $\text{MgSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$: 0,5 g ; NaCl : 0,5 g ; $\text{FeSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$: 0,01 g ; solution saline standard (voir ISP3) : 1 ml ; agar : 18 g ; eau distillée 1000 ml. pH 7,2.

✚ Milieu ISP9 (Milieu de base)

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$: 2,64 g ; KH_2PO_4 : 2,38 g ; K_2HPO_4 : 5,65 g ; $\text{MgSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$: 1 g ; Solution saline : 1 ml ; eau distillée : 1000 ml ; agar : 20 g ; pH : 6,8 - 7.

✚ Solution saline : $\text{CuSO}_4, 5\text{H}_2\text{O}$: 0,64 g ; $\text{FeSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$: 0,11 g ; $\text{MnCl}_2, 4\text{H}_2\text{O}$: 0,79 g ; $\text{ZnSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$: 0,15 g ; eau distillée : 1000 ml.

✚ Dégradation des sels de sodium (**Gordon et al., 1974**).

Sel de sodium (acétate, oxalate) : 2 g, NaCl : 2 g ; $\text{MgSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$: 0,2 g ; $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$: 1 g ; KH_2PO_4 : 0,5 g ; agar : 15 g ; eau distillée 1000 ml ; solution aqueuse de rouge de phénol à 0,04% : 20 ml. pH 6,8.

La dégradation est notée positivement après virage de l'indicateur coloré du jaune au rouge-rose.

2. Milieux des activités enzymatiques

✚ Dégradation du tween 80 (**Sierra, 1957**)

Tween 80 : 2 ml ; Peptone : 10 g ; NaCl : 5 g ; $\text{CaCl}_2, 2\text{H}_2\text{O}$: 0,1 g ; Eau distillée : 1000 ml ; Agar : 18 g. pH 7,4.

La dégradation du tween 80 se manifeste par une auréole opaque autour des colonies.

✚ Dégradation de l'amidon (**Marchal et Bourdon, 1987**).

Amidon : 10 g ; KNO_3 : 1 g ; K_2HPO_4 : 0,5 g ; MgSO_4 : 0,5 g ; NaCl : 0,5 g ; FeSO_4 : 0,01 g ; Agar : 18 g ; Eau distillée 1000 ml. pH 7,4.

✚ Dégradation de la caséine du lait (**Gordon et al., 1974**).

Peptone : 10 g ; NaCl : 5 g ; Extrait de levure : 3 g ; Agar : 20 g ; Eau distillée : 1000 ml ; Lait écrémé : 100 g. pH 6.5 - 7.2.

✚ Dégradation de la cellulose

CMC (cellulose) : 10 g ; KNO_3 : 2 g ; K_2HPO_4 : 4 g ; Na_2PO_4 : 4 g ; CaCl_2 : 0,001 g ; MgSO_4 : 0,2 g ; FeSO_4 : 0,004 g ; Agar : 15 g ; Eau distillée : 1000 ml. pH = $7 \pm 0,2$.

Test d'antagonisme

✚ Milieu Mueller Hinton (MH)

Extrait de viande : 2 g ; Hydrolysate acide de caséine : 17,5g ; Amidon : 1,5 g ; Agar : 10 g ; Eau distillée : 1000 ml. pH=7,4

✚ Gélose Nutritive (GN)

Extrait de viande : 1 g ; extrait de levure : 2 g ; peptone : 5 g ; chlorure de sodium : 5 g ; Agar : 15 g ; Eau distillée : 1000 ml. pH = 7.

ANNEXE III

Photographies illustrant les résultats du test de résistance aux antibiotiques et du test d'antagoniste des deux souches TC1 et TC2.

✚ Test de résistance aux antibiotiques

✚ La souche TC1



Figure 15 : -a- Résistance de la souche TC1 à l'antibiotique Triméthoprim.

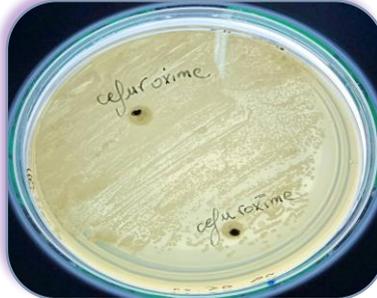


Figure 15 : -b- Résistance de la souche TC1 à l'antibiotique Cefuroxime.



Figure 15 : -c- Résistance de la souche TC1 à l'antibiotique Colistine.

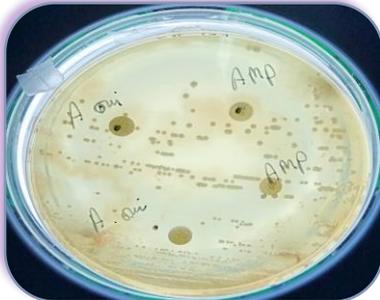


Figure 15 : -d- Résistance de la souche TC1 à l'antibiotique Acide Oxalinique et l'Ampicillin.



Figure 15 : -e- Résistance de la souche TC1 à l'antibiotique Cefotaxime et l'Amoxicillin.

Figure 15 : Mise en évidence de la résistance de la souche TC1 aux antibiotiques testés.

✚ La souche TC2

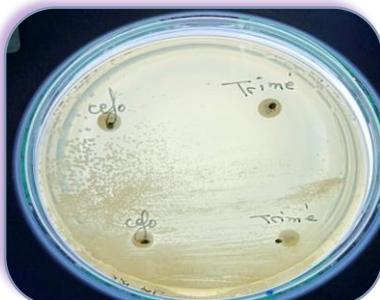


Figure 16 : -a- Résistance de la souche TC2 à l'antibiotique Triméthoprim et Cefotaxime.

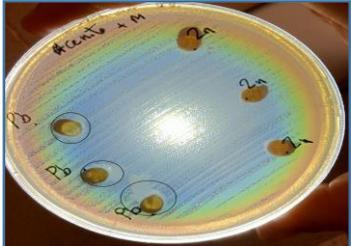
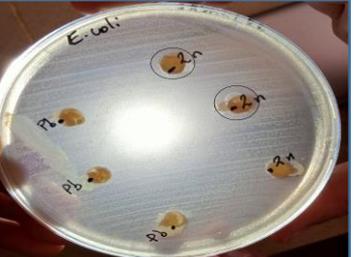
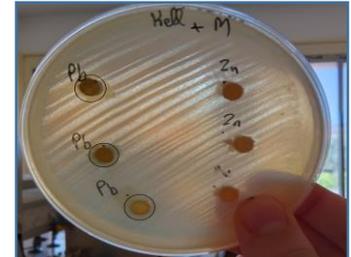
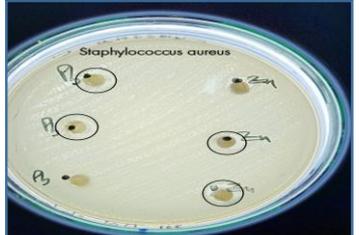
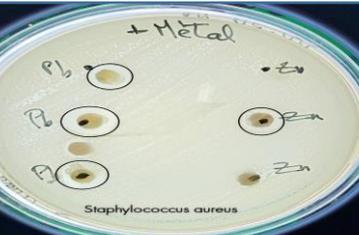
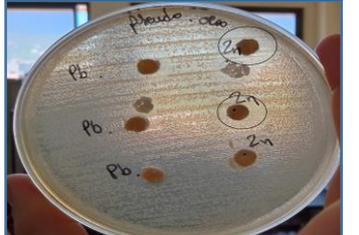
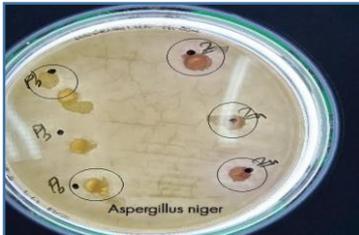
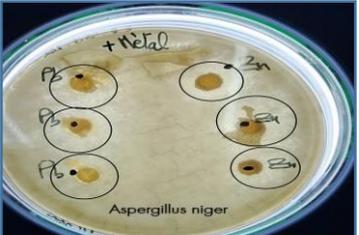


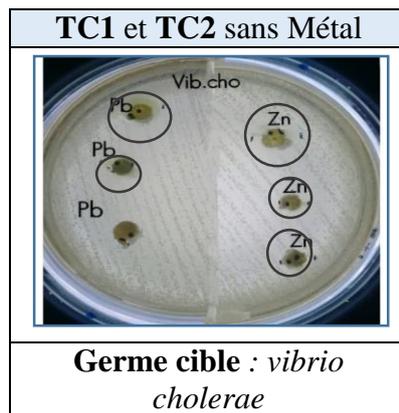
Figure 16 : -b- Résistance de la souche TC2 à l'antibiotique cefuroxime, Colistine et l'Ampicillin.



Figure 16 : -c- Résistance de la souche TC2 à l'antibiotique Acide Oxalinique et l'Amoxicillin.

Figure 17 : Mise en évidence de la résistance de la souche TC2 aux antibiotiques testés.

TC1 et TC2 sans Métal	TC1 et TC2 avec Métal	
		
<p>Germe cible : <i>Bacillus cereus</i>.</p>	<p>Germe cible : <i>Acinetobacter baumannii</i>.</p>	
		
<p>Germe cible : <i>Escherichia coli</i>.</p>	<p>Germe cible : <i>Klebsiella pneumoniae</i>.</p>	
		
<p>Germe cible : <i>Staphylococcus aureus</i>.</p>	<p>Germe cible : <i>salmonella typhi</i></p>	
		
<p>Germe cible : <i>Pseudomonas aeruginosa</i>.</p>	<p>Germe cible : <i>vibrio cholerae</i></p>	
		
<p>Germe cible : <i>Aspergillus niger</i>.</p>		



Plomb (Pb) pour TC2 ; Zinc (Zn) pour TC1.

Figure 18 : Photographie illustrant les zones d'inhibitions de l'activité antimicrobienne des souches **TC1** et **TC2** contre les différents germes cible testés.

Résumé

L'étude morphologique des deux isolats a permis de la rattacher au genre *Streptomyces*. La caractérisation physiologique a montré que les deux souches ont la capacité de dégrader différents composés chimiques et à produire différentes enzymes (amylase, cellulase, lipase, peptidases) et elles peuvent se développer à des pH alcalins, à basses températures (4°C) et à des concentrations moyennes de NaCl, ce qui fait d'elles des bactéries alcalophiles psychrotrophes et halophiles modérées. Cette étude a permis aussi de mettre en évidence la résistance des deux souches aux différents antibiotiques testés (Triméthoprime, Ampicilline, Amoxicilline, Céfotaxime, Acide Oxalique, Colistine, Cefixime). Un test d'antagonisme a également été réalisé à l'égard des différentes bactéries à Gram positif (*Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, SARM), Gram négatifs (*Enterococcus faecalis*, *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella Typhi*, *Vibrio cholerae*) et des deux champignons (*Aspergillus niger*, *Penicillium* sp). La mise en évidence de l'activité antibiotique sur le milieu Mueller Hinton (MH), en présence et en absence du métal (Zinc et Plomb) a montré que la souche **TC1** a une activité importante en absence du Zinc, contrairement à la souche **TC2**, qui présente une importante activité en présence du plomb.

Mots clés : Zinc ; Plomb ; caractérisation des actinobactéries ; *Streptomyces* ; Résistance bactérienne.

Abstract

The morphological study of the two isolates made it possible to attach it to the genus *Streptomyces*. Physiological characterization showed that both strains have the ability to degrade different chemical compounds and produce different enzymes (amylase, cellulase, lipase, peptidases) and they can grow at alkaline pH, low temperatures (4°C) and at medium concentrations of NaCl, which makes them alkalophilic bacteria psychrotrophs and moderate halophiles. This study also made it possible to highlight the resistance of the two strains to the various antibiotics tested (Trimethoprim, Ampicillin, Amoxicillin, Cefotaxime, Oxalinic Acid, Colistin, Cefixime). An antagonism test was also carried out against the various Gram-positive bacteria (*Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, MRSA), Gram-negative bacteria (*Enterococcus faecalis*, *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella Typhi*, *Vibrio cholerae*) and the two fungi (*Aspergillus niger*, *Penicillium* sp). Demonstration of antibiotic activity on Mueller Hinton (MH) medium, in the presence and absence of the metal (Zinc and Lead) showed that the **TC1** strain has significant activity in the absence of Zinc, unlike the **TC2** strain, which exhibits significant activity in the presence of lead.

Keywords: Zinc; Lead; characterization of actinobacteria; *streptomyces*; Bacterial resistance.