

SEPARATION ET CARACTERISATION PRELIMINAIRE D'ANTIBIOTIQUES PRODUITS PAR UNE SOUCHE REPRESENTATIVE D'ACTINOMYCETES ISOLES DE SOL ARIDE DE LA REGION DE BISKRA

Reçu le 17/06/2007– Accepté le 23-10/2008

Résumé

Une souche d'actinomycètes isolée d'un échantillon de sol aride de Biskra, caractérisée comme appartenant à la série rouge du genre *Streptomyces*, active contre trois bactéries à coloration de Gram positive (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* et *Streptococcus faecalis*) et deux bactéries à coloration de Gram négative (*Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*) a fait l'objet de cette étude.

L'étude cinétique de la croissance et de la production d'antibactériens a montré que l'activité antibactérienne est maximale au neuvième jour de fermentation. Les molécules bioactives du surnageant de culture sont extraites par trois solvants de différentes polarités. Les plus grandes zones de lyse ont été observées avec l'extrait d'acétate d'éthyle.

Les substances antibactériennes, extraites du mycélium, résistent à différents pH (de 2 à 8), gardent leur stabilité après 30 min de chauffage à 100°C et même après congélation à -20°C. La chromatographie sur papier, de l'extrait du mycélium, selon la technique de Betina révèle la présence de deux composés bioactifs différents.

Mots-clés: actinomycète, antibactériens, sols aride, extraction, séparation, chromatographie.

Abstract

An actinomycete strain isolated from arid soil sample from Biskra region, assigned to the red series of *Streptomyces* genus, active against three Gram-positive bacteria (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* and *Streptococcus faecalis*) and two Gram-negative bacteria (*Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*) was the subject of this report.

Kinetics of growth and antibacterial metabolites production showed that activity reach its maximal value in the ninth day of fermentation. Antibacterial molecules were extracted from culture supernatant by three solvents of varying polarity. Activity was concentrated in ethyl acetate extract.

Antibacterial substances, extracted from the mycelium, resist to different pH (from 2 to 8), keep their stability after 30 min of heating at 100°C and even after freezing at -20°C. Betina paper chromatography, of the mycelium extract, reveals the presence of two different bioactive compounds.

Key-words: actinomycetes, antibacterials, arid soil, extraction, separation, chromatography.

S. REGHIOUA
F. BOUGHACHICHE
L. OULMI
H. ZERIZER
M. KITOUNI
A. BOUDEMAGH
A. BOULAHFROUF¹

¹Laboratoire de génie microbiologique et applications.
Département des Sciences de la Nature et de la vie/ Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie/Université Mentouri Constantine. Algérie.

ملخص

(A9) ()
Streptomyces

100 30 (8 2) pH
Betina

20-

Depuis quelques années, on assiste à un important développement des résistances bactériennes aux antibiotiques (12,13). Les maladies infectieuses, que l'on croyait en passe d'être jugulées, font, depuis une vingtaine d'années, un retour sur le devant de la scène. Un grand nombre de maladies "nouvelles" se sont en effet manifestées, comme la légionellose, et la borréliose (7), il peut aussi s'agir de variants particuliers de certains germes (choléra El Tor, maladie de Creutzfeldt-Jakob, grippe), ou encore de souches qui se sont trouvées sélectionnées en raison de leur résistance vis à vis des traitements habituels (paludisme, tuberculose).

Certaines maladies transmises par les aliments sont considérées comme émergentes parce qu'elles sont devenues plus courantes récemment. D'autres agents pathogènes transmis par les aliments sont considérés comme émergents parce qu'ils sont nouveaux ou parce que le rôle de la nourriture dans la transmission n'a été reconnu que récemment. Ainsi se trouvent créées des situations nouvelles et les circonstances favorisant à l'émergence de ces maladies infectieuses résultent tout à la fois de l'évolution des agents pathogènes, de déséquilibres écologiques, de progrès technologiques et de changements comportementaux. Ces constats justifient l'urgence de disposer de nouvelles molécules d'antibiotiques.

Les actinomycètes et particulièrement les Streptomycètes représentent la principale source de métabolites secondaires à activité antimicrobienne et les recherches les plus récentes se sont efforcées à diversifier les sources d'actinomycètes en explorant des échantillons provenant d'habitats extrêmes (5, 8, 24).

Dans ce but, une étude préliminaire de l'activité antibactérienne d'une souche d'actinomycètes a été réalisée. Nous nous sommes fixés comme objectifs essentiels : l'étude cinétique de la croissance et de la production d'antibiotiques, l'extraction des molécules bioactives, l'étude de leur stabilité ainsi que la séparation et la classification, par la technique chromatographique de Betina (3), des molécules antibactériennes produites.

MATERIEL ET METHODES

Le microorganisme producteur

La souche actinomycétale notée A9 a été isolée à partir d'un échantillon de sol aride de la région de Biskra dans le cadre d'un travail antérieur. Elle a été sélectionnée pour l'importance de son activité antibactérienne contre les bactéries-test suivantes:

Escherichia coli ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus cereus* et *Streptococcus faecalis* (souches provenant du Centre Hospitalo-universitaire de Constantine) (17).

Etude cinétique de la croissance et de la production d'antibiotiques

La souche A9 est cultivée sur milieu GB (glycérol, 20 g ; amidon soluble, 20 g ; peptone, 10 g ; extrait de viande, 5 g ; CaCO₃, 3 g ; eau distillée, 1000ml ; agar, 15 g). Le milieu est inoculé d'une quantité de spores de telle manière que l'opacité du mélange sera équivalente à 2.10⁵ spores/ml. L'incubation est réalisée à 28°C sous agitation de 250 tr/min.

Des prélèvements quotidiens sont effectués. Le pH, la biomasse et l'activité antibactérienne sont mesurés pendant 14 jours. L'activité antibactérienne, du surnageant de culture et de l'extrait méthanolique du mycélium, est mise en évidence, respectivement, par la technique des puits (20) et par la technique des disques (2), contre *Escherichia coli* et *Bacillus cereus*. Le culot de centrifugation (biomasse cellulaire) est séché à 105°C jusqu'à obtention de poids constant.

Concentration et extraction des molécules bioactives du surnageant de culture

La souche A9 est cultivée dans le milieu GB liquide pendant 9 jours à 28 °C. Les cultures sont centrifugées à 11 000 tr/min pendant 20 min. Le surnageant de culture est traité par des solvants non-miscibles de différentes polarités en mélangeant 14 ml de surnageant avec 2 ml d'**acétate d'éthyle ou de benzène ou d'alcool butylique**. Les phases organiques sont récupérées et analysées par la technique des disques (2) contre les bactéries-tests.

Stabilité des molécules bioactives du mycélium

L'activité antibactérienne de l'extrait du mycélium est recherchée par la technique des disques après traitement :

-à différentes températures en incubant 5 ml de l'extrait méthanolique pendant 30 min à 50°C, 70°C, 100°C et après congélation à -20°C

-à différents pH (de 2 à 10) en ajustant 5 ml de l'extrait méthanolique concentré (éaporé jusqu'à obtention d'un résidu sec et repris dans de l'eau distillée) avec une solution de NaOH ou HCl (1N) et en le laissant pendant 2 heures à 4° (9, 22, 23).

Séparation et caractérisation préliminaire des molécules bioactives du mycélium

Elle a été effectuée par la technique de chromatographie sur papier décrite par BETINA (3). Celle-ci consiste à analyser des échantillons de l'extrait du mycélium simultanément dans quatre systèmes de solvants de migration principaux. D'après les résultats de cette étape, les molécules peuvent être classés en 5 classes et 14 sous-classes possibles. La classification est achevée en utilisant des systèmes de solvants de migration additionnels qui seront choisis selon la classe trouvée dans la première étape.

Les systèmes de solvants principaux utilisés dans la première étape sont : **1** (eau distillée) ; **2** (n-butanol saturé en eau) ; **3** (acétate d'éthyle saturé en eau) et **4** (benzène saturé en eau).

Les systèmes de solvants additionnels sont: **I** (isoamylacetate - méthanol-acide formique 99% - eau (40 : 20 : 10 : 30)) ; **J** (n-butanol - méthanol - eau (4 : 10 : 50)) ; **K** (méthanol - n-hexane (60 : 40)) ; **L** (benzène - cyclohexane -tampon phosphate 0.15 M. pH7,4 (5 : 35 : 60).

La révélation des chromatogrammes se fait par la technique de bioautographie (**4**) contre une bactérie-test.

RESULTATS ET DISCUSSION

Etude cinétique de la croissance et de la production d'antibactériens

La phase de latence est pratiquement inexistante. Durant la phase de croissance le poids sec augmente rapidement pendant les 24 premières heures de fermentation et plus lentement entre le premier et le cinquième jour (figure 1). Cette phase est marquée par une acidification du milieu de culture qui peut être expliquée par une libération d'acides organiques.

La phase stationnaire commence après cinq jours de fermentation. Elle est caractérisée par une période de faible croissance accompagnée d'une faible augmentation du pH qui est probablement due à la dégradation des sources azotées. Pendant cette phase nous avons observé une augmentation du poids sec qui peut être expliquée par la faible précision de la technique. En effet, selon MARTIN et MCDANIEL (15), le dosage des acides nucléiques représente l'une des techniques les plus favorables permettant de suivre la croissance avec plus de précision chez les microorganismes filamenteux.

La phase de déclin a été caractérisée par une diminution du poids sec et un pH acide qui demeure constant entre le 12^{ème} jour et le 14^{ème} jour.

L'activité antibactérienne du surnageant de culture n'a pas pu être détectée par la technique des puits à cause de la faible concentration des substances antibactériennes dans ce dernier. Selon Bushell *et al.* (6, 14), ce phénomène peut être expliqué par le fait qu'en milieu liquide et à cause de l'agitation, les filaments se fragmentent et les petits fragments se trouvent incapables de produire des quantités importantes d'antibiotiques.

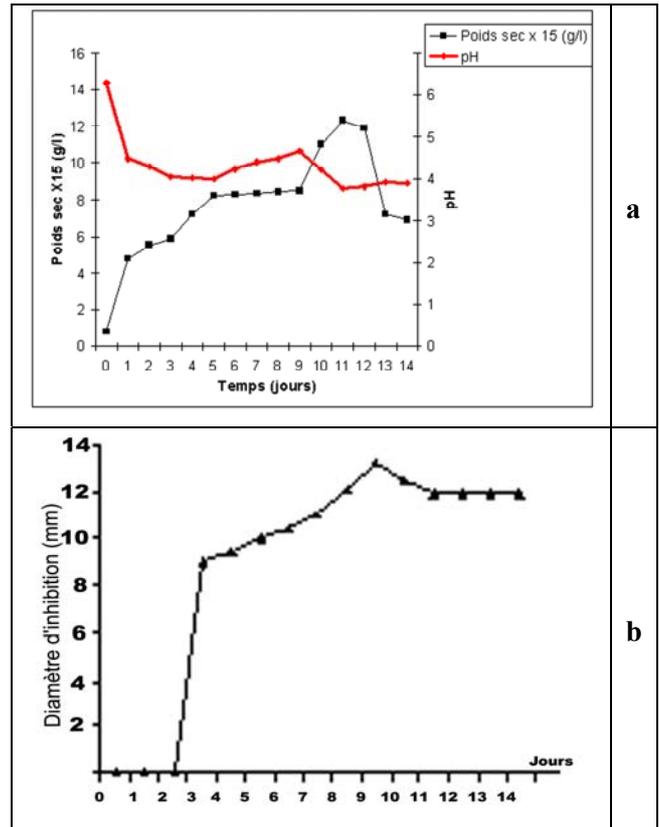


Figure 1: Cinétiques de la croissance, du pH (a) et de la production d'antibactériens (b) mesurée par le diamètre d'inhibition

L'activité antibactérienne de l'extrait méthanolique du mycélium contre les souches de *Bacillus cereus* et d'*Escherichia coli* apparaît après trois jours de fermentation, atteint son maximum vers le 9^{ème} jour et reste constante jusqu'au 14^{ème} jour (figure 1, photo. 1). D'après ces résultats, la croissance et la production d'antibactériens ne sont pas liées.

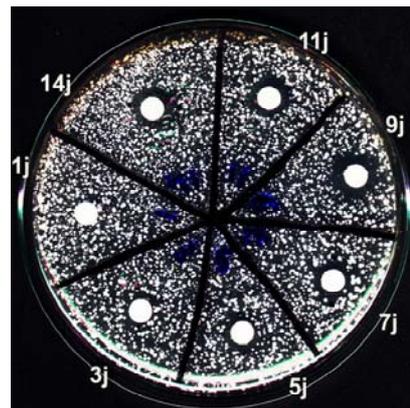


Photo 1: Cinétique de production de substances antibactériennes par la souche A9 (extrait du mycélium).

Concentration et extraction des molécules bioactives du surnageant de culture

Les trois extraits du surnageant par solvants organiques sont actifs contre les deux bactéries-tests utilisées. Ainsi les molécules bioactives de la souche A9 sont solubles, à la fois, dans le n-butanol, l'acétate d'éthyle et le benzène (figure 2). Les zones de lyse les plus importantes ont été observées avec l'extrait d'acétate d'éthyle. L'activité antibactérienne de ces extraits a été mise en évidence par la technique des disques qui permet de concentrer les composés actifs contrairement à la technique des puits. L'ensemble des résultats obtenus de la recherche de l'activité antibactérienne montre que celle-ci est concentrée dans l'extrait du mycélium.

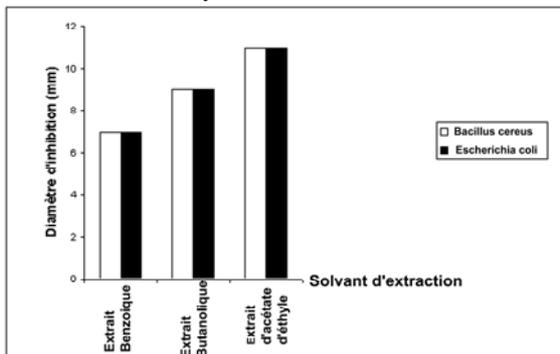


Figure 2: Activité antibactérienne des extraits organiques du surnageant de culture.

Stabilité des molécules bioactives du mycélium

Les molécules antibactériennes du mycélium sont actives à des pH allant de 2 à 8. Cette activité est optimale à un pH de 4 et devient inexistante en milieu très alcalin (pH de 9 à 10) (figure 3). Des résultats identiques ont été rapportés par plusieurs auteurs comme Hilali *et al.* (9).

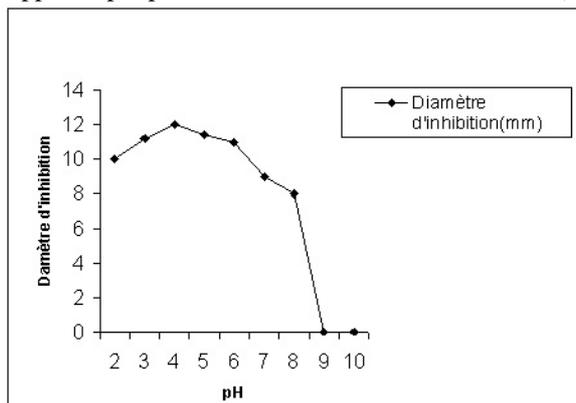


Figure 3: Effet du pH sur l'activité antibactérienne de l'extrait du mycélium.

L'extrait méthanolique garde son activité après chauffage de 30 min à 50, 70 et à 100°C et même après congélation à -20°C

Séparation et caractérisation préliminaire des molécules bioactives du mycélium

Après chromatographie, l'activité antibactérienne de l'extrait du mycélium est mise en évidence par révélation biologique en utilisant *Escherichia coli* comme bactérie-test. Deux zones actives ont été séparées **dans les systèmes 2, 3, 4, K et L.**

D'après le comportement chromatographique dans les solvants principaux (1, 2, 3 et 4) (tableau 1) et selon la classification proposée par BETINA (3) les deux composés appartiennent à la classe IV. Le premier composé (celui qui ne migre pas dans le système 4, appelé C1), appartient à la **sous-classe a**, le second composé (présentant un Rf de 0,52 dans le système 4, appelé C2), appartient à la **sous-classe c**.

Tableau 1 : Comportement chromatographique de l'extrait du mycélium dans les systèmes de solvants principaux.

Systèmes de solvants	Taches	Rf
1. Eau distillée	1	0
2. n-butanol saturé en eau distillée	2	0,74 ; 0,92
3. Acétate d'éthyle saturé en eau distillée	2	0,81 ; 0,95
4. Benzène saturé en eau distillé	2	0 ; 0,52.

Les rapports frontaux obtenus après migration dans les systèmes de solvants additionnels sont regroupés dans le tableau 2. Les différentes combinaisons qui peuvent être réalisées avec l'ensemble des valeurs de Rfs permettent de rapprocher le composé C1 de la cyanéine, antibiotique appartenant au groupe des macrolides qui sont essentiellement produits par des actinomycètes du genre *Streptomyces*. Le composé C2 présente un comportement unique qui ne peut être rapproché à aucun antibiotique proposé par BETINA (3) et semble être intéressant.

Tableau 2: Comportement chromatographique de l'extrait du mycélium dans les systèmes de solvants additionnels.

Système de solvant	Taches	Rf
I	1	0,92
J	1	0,78
K	2	0,57 ; 0,91
L	2	0 ; 0,47

I: Isoamylacétate-méthanol-acide formique 99%-eau (40:20:10:30); **J:** n-butanol-méthanol-eau (4:10:50); **K:** Méthanol-n-hexane (60:40); **L:** Benzène-cyclohexane-tampon phosphate 0,15M pH 7,4 (5:35:60)

CONCLUSION

L'activité de la souche A9 est, à l'évidence même, très intéressante parce qu'elle concerne à la fois les bactéries à Gram positif et celles à Gram négatif. Les molécules antibactériennes sont secrétées dans le milieu de culture et associées au mycélium. L'acétate d'éthyle semble être le solvant le plus approprié pour extraire les molécules bioactives du surnageant. Les molécules antibactériennes extraites du mycélium par le méthanol pur résistent à différents pHs (de 2 à 8) et conservent leur stabilité après 30 min de chauffage à 100°C ou même après congélation à -20°C. La chromatographie sur papier a révélé que l'extrait du mycélium est constitué, au moins, de deux composés bioactifs différents.

En perspectives, il serait nécessaire de continuer l'étude, par la purification complète des molécules produites (en utilisant d'autres techniques chromatographiques comme l'HPLC) et de déterminer leurs structures par l'utilisation de plusieurs techniques spécifiques comme la spectroscopie d'absorption en lumière UV-VIS, la spectroscopie d'absorption en lumière IR, la spectroscopie de masse et la résonance magnétique nucléaire.

REFERENCES

- [1]- Abdel-bar N., Harris N. D. and Rill R. L (1987). Purification and properties of an antimicrobial substance produced by *Lactobacillus bulgaricus*. *J. Food Sci.* **52**: 411-415.
- [2]- Barry A. L. , Garcia F. and Thrupp L. D. (1970). An improved single-disk method for testing the antibiotic susceptibility of rapidly growing pathogens. *Am. J. Clin. Pathol.* **53**: 149-158.
- [3]- Betina V. (1965). Paper chromatography of antibiotics. *Chromato. Rev.* **7**: 121-166.
- [4]- BETINA V. (1973). Bioautography in paper and thin-layer chromatography and its scope in the antibiotic field. *J. Chromato.* **78**: 41-51.
- [5]- Boudemagh A., Kitouni M., Boughachiche F. Hadiken H., Oulmi L., Reghioua S., Zerizer H., Couble A., Mouniee D., Boulahrouf A. et Boiron P. (2005). Isolement et identification moléculaire de quelques sols sahariens du sud-est de l'Algérie. Etude de l'activité fongique des souches isolées. *J. Mycol. Medical.* **15** : 39-44.
- [6]- Bushell M. E. , Dunstan G. L. and Wilson G. C. (1997). Effect of small scale culture vessel type on hyphal fragment size and erythromycin production in *Saccharopolyspora erythraea*. *Biotech. Lett.* **19** : 49-52.
- [7]- Decre D. et Courvalin P. (1997). De l'intérêt d'antibiotiques nouveaux. *Bull. Soc. Fr. Microbiol.* **12**: 160-164.
- [8]- El-Naggar M. Y. , EL Assar S. and Abdulgawad S. (2006). Meroparamycin production by newly isolated *Streptomyces* sp. strain : Taxonomy, Fermentation, Purification and Structural Elucidation. *J. Appl. Microbial.* 432-438.
- [9]- Hilali L. , Khatabi A. , Nsarlah N. , Malki A. et Finance C. (2002). Isolement des nouvelles souches d'Actinomycètes productrices de substances antifongiques a partir du milieu naturel marocain. *Rev. Biol. Biotechnol.* **2**: 49-53.
- [10]- Kozak W. , Bardowski J. and Drobzanski W. T. (1978). Lactosterpeins-acid bacteriocin produced by lactic streptococci . *J. dairy Res.* **45**: 247-257.
- [11]- Lederer E. (1960). Chromatographie des antibiotiques. *Chromatographie en chimie organique et biologique.* Masson, Paris. **2**: 791-819.
- [12]- Leif C. E. Larson. (2005). Bounty from deep: An investigation of the antimicrobial properties of two species from phylum porifera : A thesis submitted in partial fulfilment of the Honours thesis. University of Winnipeg.
- [13]- Maccrain M. and Heimscheidt T. (2000). Isolation of an antibiotic found in the marine bacterium *Alteromonas rubra*. Berkeley. 1-14.
- [14]- Martin S. M. and Bushell M. F. (1996). Effect of hyphal morphology on bioreactor performance on antibiotic producing *Saccharopolyspora erythraea* culture. *Microbiol.* **142** : 8.
- [15]- Martin J. F. and McDaniel L. E. (1975). Kinetics of biosynthesis of polyene macrolide antibiotics in batch cultures: Cell maturation time, *Biotechnol. Bioeng.* **17**: 925-938.
- [16]- Mincer T. J. , Jensen P. R. , Kauffman C. A. and Fenical W. (2002). Widespread and persistent populations of a major new marine Actinomycete taxon in ocean sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **68** : 5005-5011.
- [17]- Reghioua S. , Boughachiche F. , Zerizer H. , Oulmi L. , Kitouni M. , Boudemagh A. et Boulahrouf A. (2006). Activité antibactérienne d'actinomycètes rares isolées d'échantillons de sol aride du sud-est Algérien. *Antibiotiques.* **8**: 147-152.
- [18]- Soliveri J. , Arias M. E. and Laborda F. (1987). PA-5 and PA-7, pentaene and heptaene macrolide antibiotics

produced by a new isolate of *Streptovertivillium* from Spanish soil . Appl. Microbiol. Biotechnol. **25**: 366-371.

- [19]- Strohl W. R. (1999). Secondary metabolites, Antibiotics. Encyclopedia of bioprocess technology : fermentation, biocatalysis and bioseparation. 2348-2365.
- [20]- Tortorano A. M. , Cabrini E. and Viviani M. A. (1979). Sensibilité *in vitro* des levures à cinq antibiotiques. Comparaison de deux de deux méthodes C.M.I. en gélose et méthode des disques. . Bull. Soc. Fr. Myc. Med. **8**: 69-74.
- [21]- Wardell J. N. and Bushell M. E. (1999). Kinetics and manipulation of hyphal breakeage and its effect on antibiotic production. Enz. Microbial. Tech. **25** : 404-410.
- [22]- Woo J. H. , Kitamura E. Myouga H. and Kamei Y. (2002). An antifungal protein from the marine bacterium *Streptomyces* sp. Strain AP77 is specific for *Pythium pophyrae*, a causative agent of red disease in *Porphyra* spp. Appl. Environ. Microbiol. **68**: 2666-2675.
- [23]- Zbinovski V. , Hausman W. K. , Wetzel E. R. , Borders D. B. and Patterson E. L. (1968). Isolation and characterisation of antibiotic LL-AC541. Appl. Microbiol. **16**: 614-616.
- [24]- Zitounni A. , BOUDJELLA H. , MATHIEU F. , SABAOU N. AND LEBRIHI A. (2004). Mutactimycin P R , a new anthracycline antibiotic from *Saccharothrix* sp. SA103 :Taxonomy, Fermentation, Isolation and biological activities. J. Antibiotics. **57**: 6, 367-372.