

IDENTIFICATION D'UNE ACTINOMYCETALE, PRODUCTRICE D'ANTIBACTERIENS, ISOLEE DE SOLS ARIDES DE LA REGION DE BISKRA.

Reçu le 09/06/2004 – Accepté le 10/03/2005

Résumé

Cinquante cinq colonies sont prélevées, sur la base de l'aspect caractéristique des actinomycetales, à partir des milieux d'isolement ensemencés par d'échantillons de sols arides de la région de Biskra. Sur cet ensemble, dix souches sont purifiées sur un milieu sélectif additionné d'antifongique et d'antibactérien actif seulement sur les bactéries à coloration de Gram négative. Toutes les souches produisent des substances bioactives vis-à-vis des bactéries à coloration de Gram positive et / ou à coloration de Gram négative. Une souche représentative, active sur toutes les bactéries tests utilisées est identifiée par l'étude des caractères culturels, morphologiques, physiologiques et biochimiques comme appartenant au genre *Streptomyces*. L'ensemble de ces caractères permet de la rapprocher à deux espèces *Streptomyces antibioticus* et *Streptomyces rochei*.

Mots clés : Actinomycetales, Substances bioactives, Identification, *Streptomyces*.

Abstract

Fifty-five colonies are preleved following the catacteritical aspect of Actinomycetales, from isolation mediums ensemenced by soil samples collected from desert region of Biskra. Ten strains were purified on selective medium with antifungal and anti negative Gram antibiotics. These strains produce bioactive substances against positive Gram and / or negative Gram bacteria. The strain A₁ with important spectrum of activity was identified with the cultural, morphological, physiological and biochemical characterisation as a member of *Streptomyces* genera. It was considering belonging near to *Streptomyces antibioticus* and *Streptomyces rochei*.

Keywords: Actinomycetales, Bioactive substances, Identification, *Streptomyces*.

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

Laboratoire de Génie
Microbiologique et
Applications – Faculté
des Sciences- Université
- Mentouri-Constantine
Route d'Ain-el-Bey
25000 Constantine.
ALGERIE.

55

Les métabolites secondaires produits par les microorganismes représentent une large source de composés d'une diversité structurale très vaste et des milliers d'entre eux sont doués d'un potentiel d'activité biologique très important. En pratique, il est prouvé que la capacité de produire différents composés est limitée à des groupes de microorganismes eucaryotes et de bactéries en particulier les actinomycètes filamenteux. C'est en 1940, après la découverte de l'actinomycine, que ces bactéries sont devenues l'objet de nombreuses recherches et elles sont extrêmement exploitées durant les années 80, en conséquence, de nouvelles structures et surtout celles des antibiotiques sont continuellement isolées à partir de ce groupe bactérien. Ainsi, ces bactéries sont devenues les premiers fournisseurs de ces métabolites (8). Les actinomycètes filamenteux sont à l'origine de 70 % des antibiotiques naturels connus dans le monde. Cependant, le taux de nouvelles découvertes à partir des cultures d' Actinomycetales isolées des sols des régions méditerranéennes et tempérées est en diminution remarquable.

D'un autre coté, la résistance bactérienne aux antibiotiques est en augmentation inquiétante car et depuis l'apparition des premiers agents anti-infectieux tels que les pénicillines et les sulfamides, les bactéries n'ont pas cessé de s'adapter à l'environnement imposé par l'utilisation massive de ces substances (6)(7). Au problème de la résistance bactérienne, il faut ajouter l'incidence des infections nosocomiales, la recrudescence des maladies anciennes et l'apparition de nouveaux pathogènes.

Streptomyces
Streptomyces rochei
Streptomyces antibioticus
:
Streptomyces

L'obtention de nouveaux antibiotiques (antibactériens et antifongiques) est devenue donc une nécessité. Pour atteindre cet objectif, de nombreuses recherches se sont orientées vers le criblage de nouvelles souches productrices. L'exploration des écosystèmes où un ou plus des facteurs environnementaux sont extrêmes (température, pH, aération ou stress osmotique) favorise la détection d' Actinomycetales pouvant, éventuellement, avoir un potentiel d'activité antibactérien et/ou antifongique important (32).

Dans ce travail, nous nous sommes fixés comme objectifs principaux l'isolement et la purification d' Actinomycetales de sols arides, de mettre en évidence l'activité antibactérienne des souches pures et de procéder à l'étude taxonomique d'une souche représentative.

MATERIEL ET METHODES

Prélèvement des colonies

Sur l'ensemble des souches isolées d'échantillons de sols arides de la région de Biskra et conservées au niveau du laboratoire, cinquante cinq colonies prélevées sur la base de l'aspect caractéristique des Actinomycetales ont fait l'objet de ce travail. Elles sont repiquées sur le même milieu qui a servi pour l'isole et purifiées sur le milieu Amidon-Caséine additionné de nystatine à 50 µg/ml et de l'acide nalidixique à 10 µg/ml (16) (29).

Coloration de Gram et observation microscopique

Elles sont effectuées selon les méthodes classiques. Les souches à coloration de Gram positive et aspect filamenteux sont conservées à 4 °C sur des géloses inclinées avec un repiquage tous les deux mois (12).

Préparation d'une suspension de spores

Elle est préparée par raclage de la surface de la culture puis conservée par congélation à -20 °C en présence du glycérol à 20 % (11).

Mise en évidence de l'activité antibactérienne

L'activité antibactérienne est recherchée, par la technique des cylindres d'Agar (21) (22)(24), contre quatre bactéries-tests de collection (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus cereus*).

Aspect macroscopique et caractères culturels d'une souche représentative

L'aspect phénotypique et les caractères culturels sont déterminés sur les milieux de culture suivants : ISP₂, ISP₃, ISP₄ et ISP₅ (21), Amidon-Caséine (17), Glucose-Asparagine (13), Hickey et Tresner (15). L'importance de la croissance, le développement du mycélium aérien sur chaque milieu., la pigmentation du mycélium aérien et celui du substrat (le dos de la colonie) et la présence de pigments diffusibles dans la gélose sont observés et notés.

Morphologie des mycéliums (aérien et de substrat)

La morphologie des mycéliums est observée par deux techniques : technique de culture sur lame (34) et technique de culture sur lamelle (30) (32).

Analyse chimique des constituants de la paroi cellulaire

Les différents isomères de l'acide 2,6-diaminopimélique et les sucres pariétaux sont déterminés par analyse chromatographique (27) de l'hydrolysât acide des cellules entières (1).

Caractères physiologiques et biochimiques

La température optimale de croissance est déterminée après culture de la souche pendant 7 jours à différentes températures (20, 25, 30, 35, 37, 40, 45, 50, 55°C) sur milieu liquide ISP₃

Le pH optimum est déterminé sur le milieu C.Y.D. tamponné à différents pH (5,5, 6,0, 6,5, 7, 7,5, 8).

L'hydrolyse de l'amidon, de la caséine et de la gélatine sont déterminées selon la méthode de **Geraldine et al. (1981) et Chaphalkar et Dey (1996)**.

L'action sur le lait écrémé (la coagulation et la peptonisation) et la réduction des nitrates sont effectuées par la méthode décrite par **Singleton (1999)**.

La production du pigment mélanoïde est observée sur les milieux solides ISP₆ et ISP₇ (18) (21).

La tolérance au chlorure de sodium est testée en milieu B.N. contenant des concentrations croissantes de chlorure de sodium (0, 3, 5, 6, 7, 9 et 10 % W/V) (3) (5).

La sensibilité à la rifampicine (50µg/ml) et à la pénicilline (G10 U.I.) est déterminée la technique de **Chun et al. (1998) et Monciardini et al. (2003)**.

L'étude de l'utilisation des sources de carbone est réalisée sur le milieu de base ISP₉ (9).

RESULTATS

Activité antibactérienne

Les résultats de l'activité antibactérienne des Actinomycetales figurent dans le tableau 1. D'après ces résultats, toutes les souches sont actives au moins vis-à-vis d'une bactérie-test. Toutes les souches inhibent la croissance des bactéries à coloration de Gram positive et à coloration de Gram négative à l'exception la souche A₂ qui n'est pas active contre les bactéries à coloration de Gram négative. Les souches A₁, A₄, A₆, A₇ et A₉ sont actives sur toutes les bactéries-tests. La souche A₁ a présenté les zones d'inhibitions les plus importantes.

Caractères culturels

Après 7 jours d'incubation, des colonies jeunes sont apparues, de forme ronde, sèches de couleur beige à jaune brun correspondant au **mycélium de substrat**. Celui-ci est formé dans les premiers stades de la croissance et s'est développé sur la gélose puis s'est enfoncé radicalement

dans le milieu, ce mycélium peut être aussi observé sur le dos de la colonie lorsque le milieu est transparent. Sur les milieux ISP₃, ISP₄, ISP₅, Amidon-Caséine, HK un aspect poudreux de couleur blanche à grise est observé dès la première semaine, c'est le **mycélium aérien**, il a continué à se développer durant la deuxième semaine. Du 14^{ème} jour jusqu'au 21^{ème} jour, le mycélium aérien a pris progressivement une couleur grise, ce changement correspond à la **formation des spores sur les extrémités des hyphes aériens** (Tableau 2).

Tableau 1 : mise en évidence de l'activité antibactérienne des Actinomycetales pures.

Souches	Activité vis-à-vis de				
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>Staphylococcus</i>	<i>Bacillus cereus</i>	
A ₁	+	++	++	++	
A ₂	-	-	+	-	
A ₃	+	+	+	-	
A ₄	+	+	+	+	
A ₅	+	-	+	+	
A ₆	+	+	+	++	
A ₇	+	+	+	+	
A ₈	-	+	+	+	
A ₉	++	++	+	+	
A ₁₀	+	-	++	++	

(-) : pas d'activité, (+) : zone d'inhibition inférieure à 15 mm, (++) : zone d'inhibition supérieure ou égale à 15 mm.

Caractères morphologiques

Les caractères phénotypiques de la souche A₁, observés sous microscope optique (grossissement x100), sont présentés dans les photographies 1, 2 et 3. La souche possède un mycélium de substrat formé de longs hyphes fins, ramifiés, non septés ni fragmentés et ne portant par de spores. A partir de ces hyphes la souche a développé un autre mycélium aérien par croissance apicale, moins ramifié que celui du substrat et se différencie aux extrémités des hyphes en longues chaînes de spores. Leur nombre est supérieur à 20 par chaîne, de forme cylindrique, non mobiles et arrangées en structures spirales. Il est à noter aussi qu'aucune autre structure n'est observée comme les sporanges ou les sclérotés.

Caractères chimiques

La révélation du chromatogramme des acides aminés a fait apparaître un spot correspondant à l'acide LL- 2,6 diaminopimélique. Le chromatogramme des sucres a révélé

l'absence de sucres caractéristiques, la souche possède donc un spectre glucidique C.

Tableau 2 : caractères culturaux de la souche représentative (A₁) sur différents milieux de cultures.

Temps d'incubation	Milieux de culture	Croissance	Pigmentation	
			Mycélium aérien	Mycélium végétatif
7 ^{ème} jours	Isp2 Isp3 Isp4 Isp5 Amidon-Caséine	Moyenne Moyenne Moyenne Moyenne Bonne	Blanc crème Gris poudreux Blanc poudreux blanc poudreux Gris poudreux	Beige Beige Beige Beige Jaune brun
	Glucose-Asparagine	Faible	Crème	Jaune brun
	HK	Bonne	Gris poudreux	Jaune brun
14 ^{ème} jours	Isp2 Isp3 Isp4 Isp5 Amidon-Caséine	Moyenne Moyenne Moyenne Moyenne Bonne	Blanc poudreux Gris poudreux Gris poudreux Gris poudreux Gris poudreux	Beige Beige Beige Beige Jaune brun
	Glucose-Asparagine	Faible	Beige	Jaune brun
	HK	Bonne	Gris poudreux	Jaune brun
21 ^{ème} jours	Isp2 Isp3 Isp4 Isp5 Amidon-Caséine	Bonne Bonne Moyenne Moyenne Bonne	Gris poudreux Gris poudreux Gris poudreux Gris poudreux Gris poudreux	Beige Beige Beige Beige Jaune brun
	Glucose-Asparagine	Moyenne	Gris poudreux	Jaune brun
	HK	Bonne	Gris poudreux	Jaune brun

Caractères physiologiques et biochimiques

Les résultats des tests physiologiques et biochimiques de la souche A₁ sont présentés dans le tableau 3.

DISCUSSION

Les colonies matures de la souche A₁ sont compactes, sèches, poudreuses, à bords plats et centres élevés. Cette forme est caractéristique des colonies du genre *Streptomyces* (2)(21). Les Actinomycetales présentant de telles colonies matures et compte tenu de la pigmentation du mycélium aérien sporulé qui a donné à ces colonies une couleur uniforme et stable, peuvent être classées dans la série **des grises** (22). L'analyse de la composition des cellules entières de la souche a révélé la présence de l'isomère LL de l'acide 2,6 diaminopimélique et l'absence de sucres caractéristiques, cette composition permet d'attribuer à la souche une paroi **de type I** qui est caractéristique soit :

-des genres *Streptomyces*, *Intrasporangium*, *Streptoverticillium*, *Kiniosporia*, *Sporichthya* appartenant tous au groupe des **Streptomycetes et genres apparentés**

-des genres *Terrabacter* et *Nocardioïde* appartenant au groupe des **Nocardioformes**

-au genre *Kitasatospora* appartenant au groupe des **genres non classés**.

La combinaison entre les caractères morphologiques et la composition chimique des cellules des actinomycètes (14) permet de situer le genre d'appartenance. L'ensemble des caractéristiques morphologiques et biochimiques étudiés de la souche A₁ permet de la rapprocher du genre *Streptomyces*. En effet, cette souche présente une température optimale à 35°C et un pH optimum entre 7 et 8, elle dégrade l'amidon, la caséine et la gélatine et elle coagule et peptonise le lait qui sont des caractères du genre *Streptomyces* (23)(28). La comparaison des caractères morphologiques, physiologiques et biochimiques étudiés de la souche A₁ avec ceux des espèces décrites dans la 9^{ème} édition du "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology", permet de rapprocher la souche à deux espèces : *Streptomyces antibioticus* et *Streptomyces rochei*. D'autres tests physiologiques, biochimiques et les techniques d'analyses de biologie moléculaire sont donc nécessaire pour la confirmation de l'identification de l'espèce.

Tableau 3 : caractères physiologiques et biochimiques de la souche représentative (A₁).

Tests physiologiques	Résultats	Tests physiologiques	Résultats
- Température optimale de croissance	35°C	- Production du pigment mélanoïde sur :	
- Croissance à 45°C	+	ISP ₆	+
- pH Optimum de croissance	7,5	ISP ₇	+
- Hydrolyse de :		- Sensibilité a :	
Amidon	+	Pénicilline G(10 U.I.)	-
Caséine	+	Rifampicine (50 µg/ml)	+
Gélatine	+	- Utilisation des substrats carbonés :	
- Peptonisation du lait	+ / -	Glucose	+
- Coagulation du lait	+	Saccharose	+
- Tolérance de NaCl (%) :		Arabinose	+
0	+	mésio-inositol	+
3	+	Galactose	+
5	+	Xylose	-
6	+	Pectine	-
7	+	Mannitol	+
9	+	Melibiose	+
10	-	Raffinose	+
- Réduction des nitrates	+	Rhamnose	+
- Production d'H ₂ S	-		

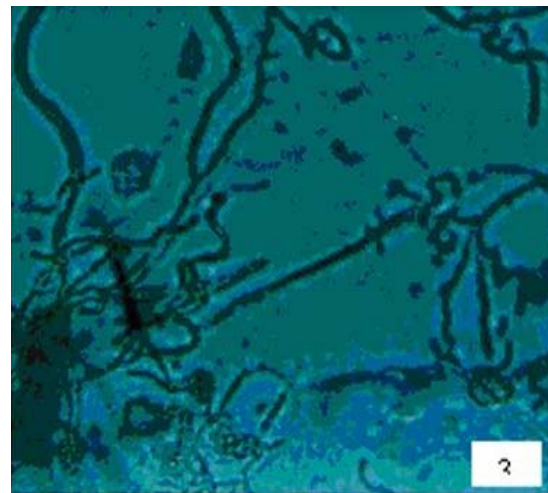
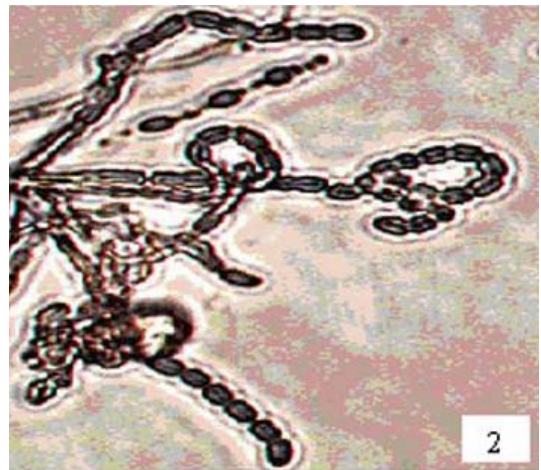
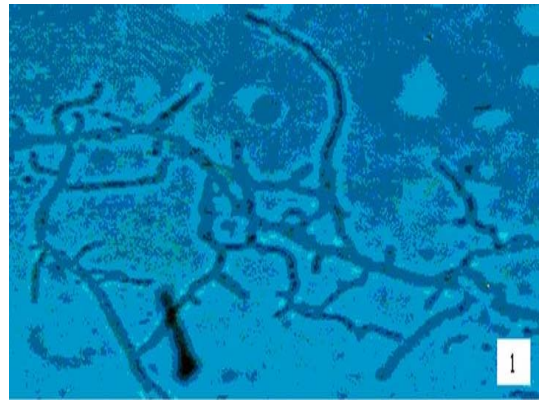


FIGURE 1: Les mycéliums de la souche A₁ sous microscope optique (Grossissementx100)

1 : le mycélium de substrat ; **2+3** : le mycélium aérien

CONCLUSION

Dix souches sont purifiées par l'addition de la nystatine et de l'acide nalidixique au milieu de culture spécifique pour Actinomycetales. L'observation macroscopique et microscopique des colonies ont permis la sélection des bactéries filamenteuses à coloration de Gram positif supposées être des actinomycètes. Ces souches sont testées en vue de mettre en évidence leur capacité de produire des métabolites antibactériens, elles ont toutes présenté une

activité inhibitrice. La souche A₁ présentant une activité importante a fait l'objet d'une étude taxonomique. L'examen macroscopique et microscopique de la souche A₁, sur différents milieux de culture, permet de suivre le développement et l'arrangement des mycéliums de substrat et aérien ainsi que la formation des spores, elle permet aussi d'observer la forme et l'aspect des colonies. L'analyse chimique des cellules entières a mis en évidence le type de paroi. L'ensemble des caractères cultureux, morphologiques ainsi que les caractères physiologiques et biochimiques étudiés, a permis de classer la souche A₁ dans le genre *Streptomyces* et de la rapprocher aux espèces : *Streptomyces antibioticus* et *Streptomyces rochei*.

REFERENCES

- [1]- Becker B., Lechevalier M.P., Gordon R. and Lechevalier H.A. (1964) Rapid differentiation between *Nocardia* and *Streptomyces* by paper chromatography of the whole-cell hydrolysates. *Appl. Microbiol.* **12** (5), 421-423.
- [2]- Cavalla M. et Eberlin T. (1994) Isolement des *Streptomyces* du sol. L'opéron **XIX**, 4 juillet, 13-17.
- [3]- Chaphalkar S.R. and Dey S. (1996) Computer assisted identification of *Streptomyces* species with high extracellular protease activity. *Actino.* **7**(2), 47-54.
- [4]- Chun J., Seang C.N., Lee K.J., Kang S.A., Goodfellow M. and Hah V.C. (1998) *Nocardia flavorosea* sp. Nov. *Inter. J. Syst. Bacteriol.* **48**, 901-905.
- [5]- Collins M.D. and Jones D. (1981) Distribution of isoprenoïde quinone structural types in bacteria and their taxonomic implications. *Microbiol. Rev.* **45** (2), 316-354.
- [6]- Decre D. et Courvalin P. (1995) De l'intérêt d'antibiotiques nouveaux. *Bull.Soc. Fr. Microbiol.* **12**(2), 160-175.
- [7]- Desnottes J.F. (1995) Recherche de nouveaux antibactériens, évolution des méthodes d'évaluation microbiologiques. *Bull.Soc.Fr. Microbiol.*
- [8]- Donadio S., Monciardini P., Alduina R., Massa P., Chiocchini C., Cavaletti L., Sosio M. and Puglia A. M. (2002) Microbiol technologies for the discovery of novel bioactive metabolites. *J. Biotechnol.* **99**, 187-198.
- [9]- Flickinger M.C. and Derew S. W. (1999) Encyclopedia of bioprocess technology : Fermentation, biocatalysis and bioseparation. John Wiley et Sons, Inc.
- [10]- Geraldine M., Schofield M. and Schaal K.P. (1981) A numerical taxonomic study of members of the *Actinomycetaceae* and related taxa. *J. Gen. Microbiol.* **127**, 237-259.
- [11]- Isik K., Chun J., Hah Y.C. and Goodfellow M. (1999) *Nocardia salmocida* nom. Rev. a fish pathogen. *Inter. J. Syst. Bacteriol.* **49**, 833-837.
- [12]- Hilali L., Khattabi A., Nssarlah N., Maliki A. et Finance C. (2002) Isolement des nouvelles souches d'Actinomycètes productrices de substances antifongiques à partir du milieu naturel marocain. *Rev. biol. Biotechnol.* **2**(1), 49-53.
- [13]- Huaxu L., Renli Q. and Jiang C. L. (1996) Diversity of soil Actinomycetes in Yunnan, China. *Appl. Env. Microbiol.*, **62**(1), 244-248.
- [14]- Lechevalier M.P. and Lechevalier H.A. (1970) Chemical composition as a criterion in the classification of aerobic Actinomycetes. *Inter. J. Syst. Bacteriol.* **20**(4), 435-443.
- [15]- Lee S.D., Kang S. O. and Hah Y. C. (2000) *Catellotospora koreensis* sp. Nov., a novel Actinomycete isolated from a gold mine cave. *Inter. J. Syst. Evol. Microbiol.* **50**, 1103-1111.
- [16]- Levadoux W., Trani M., Lortie R., Kerr D. and Groleau D. (2002) Microbiol resolution of baclofen by a new isolate of *Streptomyces Halstedii*. *J. Biosc. Bioeng.* **93** (6), 557-562.
- [17]- Mackay S.J. (1977) Improved enumeration of *Streptomyces spp.* on starch-casein salt medium. *Appl. Env. Microbiol.* **33**(2), 227-230.
- [18]- Margalith P.L. (1992) Pigment microbiology. First edition Chapman et Hall. 5-15.
- [19]- Mincer T.J., Jenson P.R., Kauffman C.A. and Fenical W. (2002) Widespread and persistent populations of a major new marine Actinomycete taxon in ocean sediments. *Appl. Env. Microbiol.* **68** (10), 5005-5011.
- [20]- Monciardini P., Cavaletti L., Schumann P., Rohde M. and Donadio S. (2003) *Conexibacter Woesei* gen. Nov., sp. Nov., a novel representative of a deep evolutionary line of descent within the class Actinobacteria. *Inter. J. Syst. Evol. Microbiol.* **53**, 3-10.
- [21]- Petrosyan P., Garcia-Varela M., Luz-Madriral A., Huitron C. and Flores M. E. (2003) *Streptomyces mexicanus* sp. Nov., a xylanolytic microorganism isolated from soil. *Inter. j. Syst. Evol. Microbiol.* **53**, 269-273.
- [22]- Saadoun L. and Al moumani F. (1997) *Streptomyces* from Jordan soils active against *Agrobacterium tumefaciens*. *Actino.* **8**(1 and 2), 29-36.
- [23]- Shiroza T., Ebisawa N., Kojima A., Furihata K., Shimazu A., Endo T., Seto H. and Otake N. (1982) Taxonomy of producing organism and production, isolation physico-chemical properties and biological activities of cirratiomycin A and B. *Agric. Biol. Chem.* **46** (7), 1885-1890.

- [24]- Shomura T., Yoshida J., Amano S., Kojima M., Inouye S. and Niida T. (1979) Studies on *Actinomycetales* producing antibiotics only on agar culture. I. Screening, taxonomy and morphology-productivity relationship of *Streptomyces halstedii*, strain SF-1993. *J. Antibiot.* **XXXII**(5), 427-435.
- [25]- Shirling E.B. and Gottlieb D. (1966) Methods for characterisation of *Streptomyces* species. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **16**(3), 313-340.
- [26]- Singleton P. (1999) *Bactériologie* 4^{ème} édition Dunod. 96, 362.
- [27]- Staneck J.L. and Roberts G.D. (1974) Simplified approach to identification of aerobic Actinomycetes by thin-layer chromatography. *Appl. Microbiol.* **28**(2), 226-231.
- [28]- Suutari M., Lignell U., Hirvonen M-R, Nevalainen A. (2001) Growth pH ranges of *Streptomyces spp.* *ASM News* **66**, 588-589.
- [29]- Suzuki S-I, Okuda T. and Komatsubara S. (2001) Selective isolation and study on global distribution of the genus *Planobispora* in soil. *Cana. J. Microbiol.* **47**(11), 979-986.
- [30]- Wang Y.M., Zhang Z.S., Xu X. L., Ruan J.S. and Wang V. (2001) *Actinopolymorpha singaporensis* Gen. Nov., sp. Nov., A novel Actinomycete from the tropical rain forest of Singapore. *Inter. J. Syst. Evol. Microbiol.* **51**, 467-473.
- [31]- Wildermuth H. and Hopwood D.A. (1970) Septation during sporulation in *Streptomyces coelicolor*. *J. Gen. Microbiol.* **60**, 51-59.
- [32]- Willams S.T. and Cross T. (1971) *Methods in microbiology*. Academic press, Londre. **4**, 295-334.
- [33]- Williams S.T., Locci R., Beswick A., Kurboke D.I., Kuznetsov V.D., Monnier F.J., Long P.F., Maycroft K.A., Palma R.A., Petrolini B., Quaroni S., Todd J. I. and West M. (1993) Detection and identification of novel Actinomycetes. *Res. Microbiol.* **144**, 653-656.
- [34]- Zaitlin B., Watson S.B., Ridal J., Satchwill T. and Parkinson D. (2003) Actinomycetes in lake Ontario: Habitats and geosmin and MIB production. Peer-review, *J. AWWA*, February, **95** (2), 113-118