



République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique

Université Larbi Ben M'hidi Oum El Bouaghi

Faculté des Sciences Exactes et des Sciences de la Nature et de la Vie

Département des Sciences de la Nature et de La Vie



N° d'ordre :

N° de série :

Mémoire

Présenté pour l'obtention du diplôme de
MASTER

Filière : Sciences Biologiques

Option : Microbiologie Appliquée

Thème :

**Évaluation de l'aptitude des actinomycètes à produire des enzymes
à activités anticancéreuses, amylolytiques et caséinolytiques.**

Présenté par :

Lekmine Ikram

kaddour Bouthaina

Medfouni Asma

Devant le jury :

Président : M. DEROUCHE K.

M.C.A Université d'Oum EL Bouaghi

Rapporteur : M. DJABALLAH C. E.

M.C.B Université d'Oum EL Bouaghi

Examineur : M. HAMAMES M.

M.A.A. Université d'Oum EL Bouaghi

Année universitaire : 2022-2023

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, nous remercions Dieu « Allah » tout-puissant, qui nous a donné la force et le courage afin d'élaborer ce mémoire.

Ce travail a été réalisé au laboratoire de microbiologie de l'Université Larbi Ben Mhidi Oum El Bouaghi.

Nous tenons à exprimer notre profonde gratitude envers notre encadreur, Mr. Djaballah Chamss Eddine, Maître de Conférences Classe B à l'université Larbi Ben Mhidi Oum El Bouaghi, pour son précieux encadrement et ses conseils éclairés. Nous sommes honorés d'avoir pu bénéficier de vos vastes connaissances et de votre précieuse expérience.

Nous souhaitons exprimer notre profonde gratitude envers le président du jury Mr. DEROUBICHE Kamel Maître de Conférences Classe A à l'Université Larbi Ben Mhidi Oum El Bouaghi, merci de nous avoir fait l'honneur de présider le jury de soutenance.

Nous souhaitons également exprimer nos remerciements à Mr. HAMAMEO Mokhtar, Maître-Assistant Classe A à l'Université Larbi Ben Mhidi Oum El Bouaghi, pour l'intérêt qu'il a porté à notre recherche et d'avoir accepté d'examiner notre travail et consacré leur temps pour évaluer ce mémoire.

Nous souhaitons exprimer notre profonde gratitude à tous nos enseignants qui ont croisé notre chemin tout au long de notre parcours universitaire. Leur dévouement, leur

expertise et leur passion pour l'enseignement ont été une source d'inspiration et d'apprentissage inestimable.

Nous tenons également à remercier chaleureusement toute la promotion de Microbiologie Appliquée, avec qui nous avons partagé de précieux moments d'étude, d'échange et de soutien mutuel.

Nous adressons également nos remerciements à tous les membres du laboratoire de Microbiologie appliquée SELLOUM Mounira, BARXOU Soumia, BELLOUHAT Ali. Nous mentionnons aussi la très bonne humeur et l'ambiance au sein de ce groupe qui nous ont permis de mener nos travaux pratiques de façon très agréable.

DEDICACES

Je dédie ce mémoire :

A mes parents qui, quels que soient les termes embrassés je

N'arriverais jamais à leur exprimer mon amour sincère.

A l'homme, mon précieux offre de dieu qui doit ma vie, ma réussite mon grand

supporteur et tout mon respect : mon père Houreddine

A la femme qui a souffert sans me laisser souffrir : mon adorable mère Zoubida

A mes frères : Adem, Oussama, ainsi qu'à mes sœurs Maria et Darine qui

ont partagé avec moi tous les moments lors de la réalisation de ce travail

A tous mes camarades d'étude et à toute personne que j'ai rencontrée

Sans oublier mes trinômes Ikram et Bouthaina pour son soutien moral, son

compréhension et son patience tout au long de ce projet.

Asma

DEDICACES

Je dédie ce mémoire :

À mes parents qui, quels que soient les termes embrassés je n'arriverais jamais à leur exprimer mon amour sincère.

Pour le grand amour de ma vie, celui qui ne me laissera jamais tomber ou ne me trompera jamais avec une autre personne. Pour celui qui me sera toujours fidèle et qui sera à mes côtés en tout temps. Pour celui qui me sera toujours fidèle et sera d'accord avec moi à tout moment.

À toi qui m'as tout donné, sans rien demander

À toi qui as tout laissé pour moi

À toi qui as tout donné pour moi ...

Merci papa

Pour vous qui avez toujours eu les bras ouverts et votre cœur plein d'amour envers moi, je vous souhaite tout le bonheur du monde.

Un million de remerciements et une vie de bonheur, à la seule personne au monde qui sera toujours avec moi.

Merci maman

À ma sœur et mon frère.

À mes trinômes Ikram et Asma pour son soutien moral, son compréhension et son patience tout au long de ce projet

À mes très chères amies surtout Redaoui Manel.

Bouthaina

DEDICACES

Je dédie cette mémoire :

Tout d'abord, à mes chers parents ma mère et mon père, qui ont été mon soutien inconditionnel tout au long de mon parcours d'études. Grâce à leurs sacrifices et leur soutien illimité, ils m'ont aidé à réaliser mon rêve d'obtenir mon diplôme. Vous avez été ma force motrice et mon soutien constant, et je vous promets de travailler dur pour vous rendre fiers de moi.

À mes chers frères Mohammed et Hasni, ainsi qu'à mes sœurs et aux jeunes pousses de la famille à ma grande famille, mon grand-père, ma grand-mère, mes oncles, mes tantes, mes cousins et mes cousines pour leur soutien et leurs encouragements tout au long de ce voyage. Vous avez partagé mes joies et mes défis, et vous avez toujours été là pour me conseiller et me soutenir émotionnellement. Je ne saurais jamais vous remercier assez pour tout ce que vous avez fait pour moi.

Ce travail est dédié à tous ceux qui m'ont soutenu et aidé, que ce soit financièrement ou moralement. Je souhaite exprimer ma reconnaissance particulière à mes collègues Southaina et Asma, ainsi qu'à mon collègue Mohammed el Tahar, qui a constamment été présent pour moi lorsque j'avais besoin d'assistance. Que Dieu vous récompense abondamment pour toutes les bonnes actions que vous avez accomplies.

Tkram

Liste des abréviations

Lal : La leucémie aigüe lymphoblastique.

DMS : Degrés, minutes, secondes.

N : Nord.

E : Est.

CE : Conductivité électrique.

ISP2 : Milieu International Streptomyces Project 2.

ISP4 : Milieu International Streptomyces Project 4.

ISP5 : Milieu International Streptomyces Project 5.

EA1 : Sol non rhizosphérique, non végétatif (très proche d'Ain).

EA2 : Sol non rhizosphérique (loin de Ain).

EA3 : Sol rhizosphérique (proche de Ain).

USD : *United States Dollar*.

Liste des figures

Figure 1 : Présentation microscopique d'actinomycètes	4
Figure 2 : Un arbre phylogénétique basé sur 97 séquences de génomiques d'espèces appartenant au phylum <i>Actinobacteria</i>	10
Figure 3 : Représentation schématique du cycle de vie des actinomycètes sporulantes.....	11
Figure 4 : Caractéristiques morphologiques des spores de différents genres d'actinobactéries ...	12
Figure 5 : Mécanisme général de la réaction de la l-asparaginase catalysée	15
Figure 6 : Action antinéoplasique de la L-asparaginase	16
Figure 7 : La vue satellite du site Ain Djarir	21
Figure 8 : Un schéma illustrant la méthode de préparation des solutions diluées.	23
Figure 9 : Un schéma illustrant la méthode d'isolement.....	24
Figure 10 : Le schéma représentatifs des tests empruntés lors de l'analyse statistique.....	25
Figure 11 : Photographie représentant les résultats de l'isolement d'actinomycètes sur le milieu ISP4 additionné de 7,5% d'NaCl.	30
Figure 12 : Photographie de l'aspect filamenteux des colonies d'actinomycètes sous microscope optique	30
Figure 13 : Photographie représentent le résultat du test d'halophile et d'halotolérance de certains isolats d'actinomycètes.	58
Figure 14 : Histogramme représentant la croissance des isolats d'actinomycètes isolée sur les trois milieux de culture.....	60
Figure 15 : Histogramme représentant la croissance des isolats d'actinomycètes isolée sur les concentrations 5%, 7,5% et 10% d'NaCl.....	61
Figure 16 : Photographie de la sporulation de certains isolats actinomycètes.....	63
Figure 17 : Histogramme représentant l'aptitude à la sporulation des isolats d'actinomycètes isolée sur les trois milieux de culture.	64
Figure 18 : Histogramme représentant l'aptitude à la sporulation des isolats d'actinomycètes sur les trois concentrations d'NaCl.	65
Figure 19 : Photographies de la production de pigments par certaines souches actinomycètes...	69

Figure 20 : Histogramme représentant la production de pigment par des isolats d'actinomycètes sur les trois milieux de culture.	70
Figure 21 : Histogramme représentant la production de pigment par des isolats d'actinomycètes isolée sur les trois concentrations d'NaCl.....	71
Figure 22 : Photographies du test d'hydrolyse de la L-asparagine par certaines souches actinomycètes avec une boîte du témoin négatif.	73
Figure 23 : Activité amylolytique de quelques souches actinomycètes.....	74
Figure 24 : Souches actinomycètes S31, S45, S48, S159 et S187 croissant sur le milieu ISP4 additionné de 7,5% d'NaCl sans développant une activité amylolytique.....	75
Figure 25 : Histogramme représentant le pourcentage des souches amylolytiques sur les concentrations 5%, 7.5% et 10% d'NaCl.....	75
Figure 26 : Résultat de la coagulation du lait écrémé par la souche S171.....	77
Figure 27 : Mise en évidence de l'activité caséinolytique de quelques souches actin.....	78

Liste des tableaux

Tableau 1 : Différents types de composants de la paroi cellulaire chez les actinomycètes	8
Tableau 2 : Liste des enzymes produites par les actinobactéries avec leur utilisation industrielle.	13
Tableau 3 : Les résultats de différentes analyses physicochimiques.	27
Tableau 4 : La classification des sols en fonction de leur pH.....	27
Tableau 5 : Les classes de la salinité du sol en fonction de la conductivité électrique de l'extrait aqueux à 25°C.....	28
Tableau 6 : La classification des sols en fonction du taux d'humidité	28
Tableau 7 : La classification des sols en fonction du taux du carbone organique	29
Tableau 8 : Dénombrement de la flore actinomycètes isolée à partir des échantillons du site Ain Djaarir.	31
Tableau 9 : Tests de normalité Shapiro-Wilk et Kolmogorov-Smirnov de la distribution de résultats de dénombrement d'actinomycètes isolés à partir trois échantillons EA1, EA2 et EA3.....	32
Tableau 10 : Les rangs moyens des valeurs de dénombrement d'actinomycètes isolés à partir des échantillons EA1, EA2 et EA3.	33
Tableau 11 : Valeurs de significations asymptotiques bilatérales obtenues de l'application du test Kruskal Wallis sur la distribution d'actinomycètes isolés à partir des échantillons EA1, EA2 et EA3.	33
Tableau 12 : Tests de normalité Shapiro-Wilk et Kolmogorov-Smirnov de la distribution les charges d'actinomycètes isolés sur les milieux de culture ISP2, ISP4 et ISP5.	35
Tableau 13 : Les rangs moyens des valeurs de dénombrement d'actinomycète sur les milieux de culture ISP2, ISP4 et ISP5.	35
Tableau 14 : Valeurs de significations asymptotiques bilatérales obtenues de l'application du test Kruskal Wallis sur la distribution d'actinomycètes isolé sur les milieux de culture ISP2, ISP4 et ISP5.....	36
Tableau 15 : Valeurs de significations asymptotiques bilatérales obtenues de l'application du test Mann-Whitney sur la distribution d'actinomycètes isolés sur les milieux de culture	36

Tableau 16 : Tests de normalité Shapiro-Wilk et Kolmogorov-Smirnov de la distribution de résultats des charges actinomycètes isolés à 5%, 7,5% et 10% d'NaCl.	38
Tableau 17 : Les moyens des valeurs de dénombrement de la d'actinomycètes isolés à 5%, 7,5% et 10% d'NaCl.....	39
Tableau 18 : Les résultats de test ANOVA appliqués sur les moyens d'actinomycètes isolés à 5%, 7,5% et 10% d'NaCl	39
Tableau 19 : Dénombrement de la flore bactérienne à partir des échantillons du site Ain Djarir.	40
Tableau 20 : Tests de normalité Shapiro-Wilk et Kolmogorov-Smirnov de la distribution de résultats de dénombrement des bactéries isolées à partir trois échantillons EA1, EA2 et EA3. ..	42
Tableau 21 : Les rangs moyens des valeurs de dénombrement de la flore bactérienne isolées à partir des échantillons EA1, EA2 et EA3.	42
Tableau 22 : Valeurs de significations asymptotiques bilatérales obtenues de l'application du test Kruskal Wallis sur la distribution de la flore bactérienne isolée à partir des trois échantillons. ..	42
Tableau 23 : Tests de normalité Shapiro-Wilk et Kolmogorov-Smirnov de la distribution de résultats de dénombrement des bactéries isolées sur les milieux ISP2, ISP4 et ISP5.	44
Tableau 24 : Les rangs moyens des valeurs de dénombrement des bactéries isolées depuis les milieux de culture ISP2, ISP4 et ISP5.	45
Tableau 25 : Valeurs de significations asymptotiques bilatérales obtenues de l'application du test Kruskal Wallis sur la distribution des bactéries isolées sur les milieux de culture ISP2, ISP4 et ISP5.....	45
Tableau 26 : Valeurs de significations asymptotiques bilatérales obtenues de l'application du test Mann-Whitney de la distribution de la flore bactérienne isolées sur les milieux de culture (ISP2 et ISP4), (ISP2 et ISP5) et (ISP4 et ISP5).	46
Tableau 27 : Tests de normalité Shapiro-Wilk et Kolmogorov-Smirnov de la distribution de résultats des charges bactériennes isolées à 5%, 7,5% et 10% d'NaCl.	47
Tableau 28 : Les rangs moyens des valeurs de résultats de dénombrement de la flore bactérienne à 5%, 7,5% et 10% d'NaCl.	48
Tableau 29 : Valeurs de significations asymptotiques bilatérales obtenues de l'application du test Kruskal Wallis sur la distribution de résultats de dénombrement de la flore bactérienne isolée à 5%, 7,5% et 10% d'NaCl.....	48

Tableau 30 : Dénombrement de la flore fongique à partir des échantillons du site Ain Djarir. ...	49
Tableau 31 : Tests de normalité Shapiro-Wilk et Kolmogorov-Smirnov de la distribution de résultats de dénombrement des moisissures isolées à partir des trois échantillons.	50
Tableau 32 : Les rangs moyens des valeurs de dénombrement des moisissures isolées à partir des échantillons EA1, EA2 et EA3.	51
Tableau 33 : Valeurs de significations asymptotiques bilatérales obtenues de l'application du test Kruskal Wallis sur la distribution de dénombrement des moisissures isolées à partir des échantillons EA1, EA2 et EA3.	51
Tableau 34 : Tests de normalité Shapiro-Wilk et Kolmogorov-Smirnov de la distribution des charges des moisissures isolées sur les milieux ISP2, ISP4 et ISP5.	53
Tableau 35 : Les rangs moyens des valeurs de dénombrement des moisissures isolées sur les trois milieux de culture ISP2, ISP4 et ISP5.	53
Tableau 36 : Valeurs de significations asymptotiques bilatérales obtenues de l'application du test Kruskal Wallis sur la distribution des moisissures isolées sur les milieux de culture ISP2, ISP4 et ISP5.	53
Tableau 37 : Tests de normalité Shapiro-Wilk et Kolmogorov-Smirnov de la distribution de résultats les charges des moisissures isolées à 5%, 7,5% et 10% d'NaCl.	55
Tableau 38 : Les rangs moyens des valeurs de résultats de dénombrement des moisissures isolées à 5%, 7,5% et 10% d'NaCl.	55
Tableau 39 : Les rangs moyens des valeurs de résultats de dénombrement des moisissures isolées à 5%, 7,5% et 10% d'NaCl.	56
Tableau 40 : Le code des souches actinomycètes isolées à partir des trois échantillons sur les milieux ISP2, ISP4 et ISP5 additionnés de 5%, 7,5% et 10% d'NaCl.	56
Tableau 41 : Résultats du test d'halophile et d'halotolérants des isolats actinomycètes.	57
Tableau 42 : L'aptitude à la croissance des isolats sur les milieux ISP2, ISP4 et ISP5 additionnés de 5%, 7,5% et 10% d'NaCl.	58
Tableau 43 : L'aptitude à la sporulation des isolats sur les milieux ISP2, ISP4, ISP5 additionnés de 5%, 7,5% et 10% d'NaCl.	62
Tableau 44 : L'aptitude à la production des pigments par les isolats sur les milieux ISP2, ISP4, ISP5 additionnés de 5%, 7,5 %, 10 % d'NaCl.	66

Tableau 45 : Résultats de l'aptitude de 36 souches à la production de la L-asparaginase.....	72
Tableau 46 : Production d'amylases chez 36 souches sur le milieu de cultures ISP4 additionnés de 5%, 7,5% et 10% d'NaCl.	73
Tableau 47 : Résultats de l'action de 36 souches actinomycètes sur le lait écrémé additionnés de 5% d'NaCl.....	76
Tableau 48 : Résultats obtenus suite au test de caséinase chez 36 isolats actinomycètes.	77

Résumé

Ce travail représente une étude de la biodiversité des actinomycètes habitants le sol du site Ain Djarir dans la région Khenchela. Les analyses physicochimiques ont révélé que ces échantillons représentaient des écosystèmes extrêmes. Différents facteurs tels que les échantillons eux-mêmes, le milieu de culture, la concentration d'NaCl ont été étudiés pour leur effet sur le dénombrement des flores actinomycètes, bactériennes non filamenteuses et fongiques. Pour évaluer l'impact de ces facteurs, une étude statistique a été réalisée du logiciel *IBM SPSS Statistics Premium Grad Pack* de la version 24. Les tests de normalité (Shapiro-Wilk et Kolmogorov-Smirnov) qui nous ont conduits vers les tests non-paramétrique Kruskal Wallis et/ou Mann Whitney pour conclure que les facteurs « échantillon » et « concentration d'NaCl » n'ont pas eu d'effet significatif sur les résultats de dénombrement. En revanche, le milieu de culture a montré une influence significative sur le nombre de flores Actinomycétales et bactérienne. 36 souches actinomycètes ont été sélectionnées en vue de tester leurs activités enzymatiques où nous avons constaté la production d'amylases, de L-asparaginase et de caséinase, respectivement, chez 86%, 63,88% et 66,66% des isolats. En outre, 69,44% des souches étudiées sont capables de provoquer une coagulation du lait écrémé.

Mots clés : actinomycètes, halophiles, halotolérants, amylase, caséinase, activité anticancéreuse.

Abstarct

This work represents a study of the biodiversity of actinomycetes inhabiting the soil of the Ain Djaarir site in the Khenchela region. Physicochemical analyses revealed that these samples represented extreme ecosystems. Various factors such as the samples themselves, the culture medium, and NaCl concentration were studied for their effect on the enumeration of actinomycete, non-filamentous bacterial, and fungal floras. To assess the impact of these factors, a statistical study was conducted using IBM SPSS Statistics Premium Grad Pack version 24 software. Normality tests (Shapiro-Wilk and Kolmogorov-Smirnov) led us to non-parametric tests such as Kruskal-Wallis and/or Mann-Whitney to conclude that the "sample" and "NaCl concentration" factors did not have a significant effect on the enumeration results. However, the culture medium showed a significant influence on the number of actinomycetal and bacterial floras. 36 actinomycete strains were selected to test their enzymatic activities, where we observed the production of amylases, L-asparaginase, and caseinase in 86%, 63.88%, and 66.66% of the isolates, respectively. Furthermore, 69.44% of the studied strains are capable of causing coagulation of skim milk.

Keywords: actinomycetes, halophiles, halotolerant, amylase, caseinase, anticancer activity.

المخلص

يمثل هذا العمل دراسة لتنوع الأكتينومايسيتس التي تعيش في التربة في منطقة عين جرير في منطقة خنشلة. أظهرت التحاليل الفيزيوكيميائية أن هذه العينات تعتبر بيئات متطرفة. تمت دراسة عوامل مختلفة مثل العينات نفسها ووسط الزرع وتركيز كلوريد الصوديوم لتأثيرها على عدد الأكتينومايسيتس والبكتيريا غير الخيطية والفطريات. تم إجراء دراسة إحصائية لتقييم تأثير هذه العوامل باستخدام برنامج تحليل احصائي. تم استخدام اختبارات الانحراف عن الطبيعة (شابيرو-ويلك وكولموجوروف-سميرنوف) التي أدت إلى استخدام اختبارات الغير معلمية (مان ويتي/كريسكال واليس). لاستنتاج بأن العوامل "العينة" و "تركيز كلوريد الصوديوم" لم يكن لها تأثير معنوي على نتائج العد. ومع ذلك، أظهر وسط الزرع تأثيراً ملحوظاً على عدد الأكتينومايسيتس والبكتيريا. تم اختيار 36 سلالة من الأكتينومايسيتس لاختبار أنشطتها الإنزيمية حيث لوحظ إنتاج الأميليز والأسباراجيناز والكازيناز على التوالي في 86% و63.88% و66.66% من العزلات. بالإضافة إلى ذلك، أظهرت 69.44% من السلالات المدروسة القدرة على تخثر الحليب قليل الدسم.

الكلمات الرئيسية: الأكتينومايسيتس، محب للملح، قادر على تحمل الملح، أميليز، كازيناز، نشاط مضاد للسرطان.

Tables des matières

REMERCIEMENTS

DEDICACES

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Résumé

Tables des matières

Introduction..... 1

Revue bibliographique

Chapitre I : Généralités sur les actinomycètes

1. Historique	3
2. Définition.....	3
3. Écologie	4
3.1. Sol	4
3.2. L'air.....	5
3.3. Le composte	5
3.4. L'eau douce et marine.....	5
3.5. Végétaux, animaux et l'homme	6
4. Taxonomie et critères de classification	6
4.1. Classification des actinomycètes	6
4.2. Critères de classification des actinomycètes	7
4.2.1. Critères morphologiques	7
4.2.2. Critères chimio taxonomiques	7
4.2.3. Critères moléculaires	9
5. Morphologie et cycle de développement	9
5.1. Morphologie.....	9
5.2. Cycle de développement	9
5.2.1. Mycélium primaire.....	11
5.2.2. Mycélium secondaire	11
5.2.3. Formation des spores	11

Chapitre II : L'intérêt des actinomycètes dans la production des enzymes

1. Production d'enzymes à partir d'actinobactéries.....	13
2. La L- asparaginase.....	14
3. Amylase	17
3.1. L'importance d'amylase	18
3.1.1. Dans le domaine industriel.....	18
3.1.2. Dans le domaine environnemental.....	19
4. La caséinase	19
Matériels et méthodes	21
1. L'écosystème étudié.....	21
1.1. Le prélèvement.....	21
2. Les analyses physicochimiques des échantillons de sol	22
2.1. La mesure du pH.....	22
2.2. La mesure de la conductivité électrique (CE 1/5ème)	22
2.3. La mesure du pourcentage d'humidité.....	22
2.4. La mesure du pourcentage du carbone organique.....	22
3. L'isolement de la microflore du sol	22
3.1. Milieux d'isolement	22
3.2. La préparation des dilutions.....	23
3.3. L'ensemencement et l'incubation	23
3.4. Dénombrement des souches.....	24
3.5. Analyse statistique des données de dénombrement	24
4. Purification des souches	25
5. Conservations des souches.....	25
6. Le test d'halophilie et d'halotolérance	25
7. Etude des caractères macroscopiques.....	25
8. Mise en évidence des activités enzymatiques	26
8.1. Recherche de la L-asparaginase	26
8.2. Recherche d'amylase	26
8.3. Recherche de caséinase	26
8.4. Action sur le lait écrémé	26

Résultats et discussion

1. Les analyses physico-chimiques.....	27
--	----

1.1. Le pH des échantillons du sol	27
1.2. La conductivité des échantillons du sol	27
1.3. Le pourcentage de l'humidité	28
1.4. Le pourcentage du carbone organique	29
2. Isolement des actinomycètes	29
3. Dénombrement de la flore Actinomycétales	30
3.1. Effet de l'échantillon sur les résultats de dénombrement des actinomycètes	31
3.2. Analyse statistique sur effet de l'échantillon du sol	32
3.3. Effet du milieu de culture sur les résultats de dénombrement des actinomycètes	34
3.4. Analyse statistique sur effet de milieu de culture	34
3.5. Effet de la concentration d'NaCl sur les résultats de dénombrement des actinomycètes ..	37
3.6. Analyse statistique sur effet de la concentration d'NaCl	38
4. Dénombrement de la flore Bactérienne	39
4.1. Effet de l'échantillon sur les résultats de dénombrement des bactéries	40
4.2. Analyse statistique sur effet de l'échantillon du sol	41
4.3. Effet du milieu de culture sur les résultats de dénombrement des bactéries	43
4.4. Analyse statistique sur effet de milieu de culture	44
4.5. Effet de la concentration d'NaCl sur les résultats de dénombrement des bactéries	46
4.6. Analyse statistique sur effet de la concentration d'NaCl	47
5. Dénombrement de la flore fongique	48
5.1. Effet de l'échantillon sur les résultats de dénombrement de la flore fongique	49
5.2. Analyse statistique sur effet de l'échantillon du sol	50
a. Test de normalité	50
5.3. Effet du milieu de culture sur les résultats de dénombrement de la flore fongique	52
5.4. Analyse statistique sur effet de milieu de culture	52
5.5. Effet de la concentration d'NaCl sur les résultats de dénombrement de la flore fongique	54
5.6. Analyse statistique sur effet de la concentration d'NaCl	54
6. Purification et conservation	56
7. Test halophile et halotolérants des isolats actinomycètes	56
8. L'aptitude à la croissance	58
8.1. L'aptitude à la croissance sur les trois milieux de culture	59
8.2. L'aptitude à la croissance sur les différentes concentrations d'NaCl	60
9. L'aptitude à la sporulation	61
9.1. L'aptitude à la sporulation sur les trois milieux de culture	63

9.2. L’aptitude à la sporulation sur les trois différentes concentrations d’NaCl.....	64
10. L’aptitude à la production des pigments.....	65
10.1. L’aptitude à la production de pigment sur les trois milieux de culture.....	69
10.2. L’aptitude à la pigmentation sur les trois différentes concentrations d’NaCl.....	70
11. La mise en évidence d’activités enzymatiques chez les actinomycètes	72
11.1. Hydrolyse de la L-asparagine	72
11.2. Hydrolyse d’amidon.....	73
11.3. Test de coagulation et de peptonisation	76
11.4. Hydrolyse de la caséine.....	77
Conclusion	79
Références Bibliographiques	81

Annexes

Introduction

Introduction

De nos jours, les biocatalyseurs sont considérés comme une technologie renforcée dans le domaine de la chimie verte puisque la valeur du secteur industriel des enzymes a été projetée à 6,3 milliards USD pour 2021 et devrait atteindre 10,5 milliards d'ici 2024. L'utilisation d'enzymes permet une sélectivité remarquable dans des conditions douces, un faible apport énergétique et une technologie non toxique (Alvarado-Ramirez, 2021).

Le marché mondial de la production d'enzymes microbiennes utilisées dans la transformation des produits laitiers connaît une croissance impressionnante ; cependant, il existe un nombre limité d'industries productrices d'enzymes sur le marché. Dans un avenir proche, le besoin de ces enzymes augmentera sans aucun doute de manière significative, essentiellement en raison de l'exigence d'importants produits laitiers de valeur nutritionnelle dans le pays pour surmonter la malnutrition et l'obésité et passer à des aliments faibles en gras et sains (Khan et Selamoglu, 2020).

Les microorganismes sont présents partout dans notre environnement, que ce soit dans le sol, l'air, les eaux et même dans certains aliments que nous consommons. Leur rôle dans notre vie devient de plus en plus important, et ils sont actuellement à l'origine du développement croissant de la biotechnologie (Smaoui, 2010).

Les actinobactéries sont des micro-organismes ubiquitaires et largement répandus dans les écosystèmes naturels. Ce groupe de bactéries se distingue par un pourcentage élevé de guanine et de cytosine dans leur ADN, et elles présentent une grande diversité de formes, de physiologies et de relations avec l'oxygène. Ces bactéries à Gram positives, qui forment des spores, font partie de l'ordre d'Actinomycétales et produisent un mycélium de substrat et aérien lorsqu'elles sont cultivées sur des milieux solides (Elisandra *et al.*, 2014).

Les actinobactéries produisent une variété des métabolites qui jouent un rôle essentiel dans leurs microenvironnements complexes et diversifiés. Ces métabolites, connus sous le nom de produits naturels ou métabolites secondaires. Les actinobactéries marines et terrestres produisent une large gamme d'enzymes biologiquement actives. Elles peuvent sécréter des protéases, des cellulases, des lipases, des Xylanase, des pectinases et des amylases. Ces enzymes sont d'une importance vitale dans l'industrie textile ou papetière, l'industrie alimentaire, ainsi que dans les applications biotechnologiques. En plus, les actinobactéries ont été découvertes comme étant une bonne source de L-asparaginase (Muhanna *et al.*, 2021).

Introduction

Notre travail cible l'isolement d'actinomycètes à partir de trois échantillons de sol du site Ain Djaarir à Khenchela et la recherche parmi les isolats obtenus ceux qui produisent des enzymes à activité amylolytique, caséinolytique et anticancéreuse.

Afin d'atteindre cet objectif, nous avons adopté la démarche suivante :

- Tout d'abord, un prélèvement de trois échantillons de sol du site Ain Djaarir situé au niveau de la wilaya de Khenchela.
- Une analyse physicochimique des trois échantillons de sol.
- Un isolement d'actinomycètes à partir de ces échantillons sur les milieux de culture ISP2, ISP4 et ISP5 additionnés de 5%, 7,5% et 10% d'NaCl et dont le pH a été ajusté à 8,0.
- Une étude statistique ciblant à déterminer un éventuel effet des facteurs « échantillon », « milieu de culture » et « concentration d'NaCl » sur les flores microbiennes isolées.
- Une caractérisation culturelle des isolats en déterminant leur aptitude à la croissance, à la production de masse sporale et de pigments.
- Et finalement, une étude de l'aptitude de certains isolats à produire des enzymes ayant des activités anticancéreuses, amylolytiques et caséinolytique.

Revue bibliographique

1. Historique

La connaissance des actinomycètes a évolué à travers 05 périodes dans l'histoire : La première a été la période médicale allant de 1877 à 1890, pendant laquelle les actinomycètes ont été connues en tant que micro-organismes pathogènes, vu les différentes pathologies causées par ses micro-organismes, notamment les nocardioses. La deuxième période allant de 1900 à 1940, selon Mariat et Sebald (1990) est caractérisée par des études sur les actinomycètes du sol particulièrement les conditions de développement de ces bactéries dans les différents milieux naturels. La période qui a suivi 1940, est celle de la découverte des antibiotiques, par la mise en évidence la production de la Streptomycine par *Streptomyces griseus*. Elle fût nommée la période de Waksman. Durant la quatrième période (1940 – 1970), le rythme de l'évolution des critères d'identification des actinomycètes s'est accéléré passant de l'identification des critères morphologiques, biochimiques et culturels à la compréhension de la physiologie bactérienne et à l'apparition de la taxonomie numérique. Enfin, depuis 1960, c'est l'ère de la biologie moléculaire, qui a révolutionné l'identification et la classification des actinomycètes, avec les travaux de Hapwood 1973. Depuis, les travaux sur l'utilisation des actinomycètes, comme sources potentielles d'antibiotiques, d'enzymes, d'antiviraux, d'anti-inflammatoires et d'agents cytotoxiques ont marqué l'histoire dans ce domaine (CHERGUI,2018).

2. Définition

Les actinomycètes sont des bactéries aérobies à Gram positif formant des spores, appartenant à l'ordre des *Actinomycetales* caractérisées avec croissance du mycélium substrat et du mycélium aérien (figure 1). Ils ont un rapport élevé en (G + C) % > 55mol %. Ils représentent l'une des plus grandes unités taxonomiques parmi les 18 lignées majeures actuellement reconnues au sein du domaine bactéries. Le nom "Actinomycètes" a été dérivé du grec « atkis » (une raie) et « mykes » (champignon), ayant caractéristiques des bactéries et des champignons mais pourtant possèdent des traits distinctifs suffisants pour les délimiter au sein du Royaume *Bacteria*. Les actinomycètes sont des producteurs potentiels d'antibiotiques et d'autres composés thérapeutiquement utiles. Les métabolites secondaires bioactifs produits par les actinomycètes comprennent : les antibiotiques, les agents antitumoraux, les agents immunosuppresseurs et les enzymes. Ces métabolites sont connus pour posséder des effets antibactériens, antifongiques, antioxydants, neurogènes, anticancéreux, anti-algues, antihelminthiques, antipaludéens et anti-inflammatoires (Hotam *et al.*, 2013).

Ils présentent des cycles de vie uniques parmi les procaryotes et jouent un rôle majeur dans le cycle de la matière organique dans le sol. Les actinomycètes ont prouvé leur capacité à produire une variété de métabolites secondaires bioactifs et pour cette raison, la découverte de nouvelles molécules bioactives par criblage de métabolites secondaires microbiens est de plus en plus importante (Hotam *et al.*, 2013).

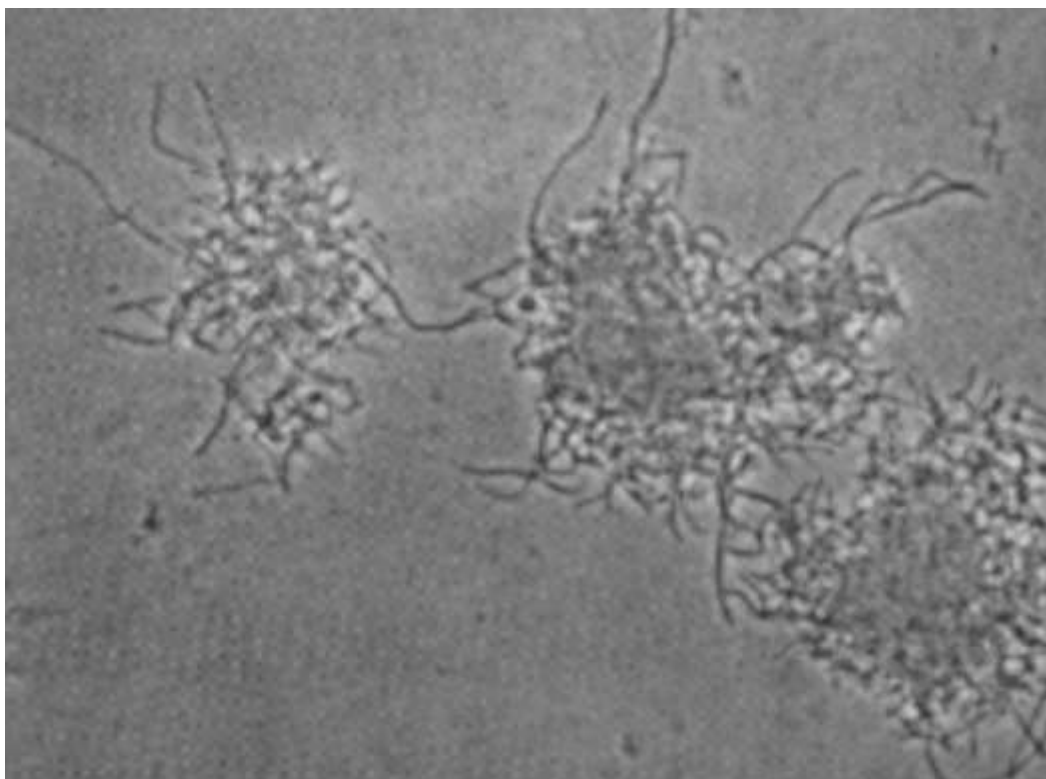


Figure 1 : Présentation microscopique d'actinomycètes (Pine *et al.*,1967).

3. Écologie

Les actinomycètes sont capables de survivre dans différents habitats et sont largement distribués dans les écosystèmes naturels. Les actinomycètes ont été regroupés en différents genres, *Streptomyces* est le genre le plus couramment isolé de l'ordre *Actinomycetales* en raison de sa grande importance en sciences médicale, en écologie et en biotechnologie (Selim *et al.*,2021).

3.1. Sol

La population d'actinomycètes est présente dans toutes les couches de sol. Toutefois, elle est plus importante dans la couche superficielle des sols et diminue progressivement avec la profondeur. Les actinomycètes sont nombreux et largement distribués dans le sol et côtoient les bactéries dans leur abondance. Ils sont largement distribués dans le sol, le compost, etc. avec des valeurs estimées allant de 10^4 à 10^8 UFC/g de sol. Ils sont sensibles à l'acidité (plage de pH

optimale de 6,5 à 8,0) et aux conditions de sols gorgés d'eau. Ils sont mésophiles (25 à 30 °C), alors que certaines espèces couramment présentes dans le compost et les fumiers sont thermophiles poussant à une température de 55 à 65 °C telles que *Thermoactinomycètes*, *Streptomyces* (Bhatti *et al.*, 2017).

3.2. L'air

La capacité des spores d'actinomycètes à être dans l'air a été détectée là où l'air contient différents types de leurs spores (Selim *et al.*, 2021).

3.3. Le composte

Dans des conditions appropriées, la décomposition initiale de ces substances riches en nutriments par les microbes mésophiles (y compris les actinomycètes) conduit à un auto-échauffement, qui fournit des conditions idéales pour une croissance rapide des actinomycètes thermophiles. Bien que des études taxonomiques récentes aient indiqué que le genre *Thermoactinomyces* ne devrait plus être inclus dans les actinomycètes, des études antérieures ont montré qu'il contient des "actinomycètes" thermophiles d'une importance écologique considérable. Les espèces *Thermoactinomyces* et *Saccharomonospora* sont des thermophiles obligatoires ; autre les genres, tels que *Micropolyspora*, *Pseudonocardia*, *Streptomyces* et *Thermomonospora*, contiennent des espèces qui sont des thermophiles obligatoires ou facultatifs (Goodfellow et Williams., 1983).

3.4. L'eau douce et marine

L'environnement aquatique varie fortement de l'environnement naturel terrestre ; les caractéristiques biologiques des actinomycètes aquatiques et leur livraison ne devraient pas être les mêmes que celles des actinomycètes du sol. Ils ont été isolés de l'eau douce ainsi que des environnements marins. La recherche sur la biodiversité des actinomycètes aquatiques n'est pas fondamentale pour les grandes études, mais importante pour l'exploitation pratique. Des études ont démontré que dans les résidus de marécages en bord de mer, les actinomycètes représentaient 2 à 5 % du groupe microbien et constituaient une population indigène. De temps en temps, les actinomycètes se développent également dans les réservoirs d'eau potable, influençant la qualité de l'eau en provoquant des odeurs de sol, dues à leur génération de métabolites secondaires volatils, par exemple la géosmine et le méthylisobornéol. Les actinomycètes des habitats aquatiques ont reçu presque peu d'attention. Les genres principalement présents dans l'eau sont *Actinoplanes*, *Micromonospora*, *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Streptomyces* et *Thermoactinomyces*. Un groupe de

genres a été isolé de l'eau de mer et des sédiments marins, notamment *Streptomyces*, *Micromonospora*, *Microbispora* et *Nocardia*. Ces dernières années, les micro-organismes marins se sont révélés indispensables dans la recherche de nouveaux éléments microbiens présentant des propriétés antimicrobiennes, antivirales, antitumorales, anticoagulantes et cardioactives (Mohammed *et al.*, 2018).

3.5. Végétaux, animaux et l'homme

Les actinobactéries sont également associées à des hôtes eucaryotes dans diverses niches comme l'exosquelette de certaines fourmis tropicales tels que *Kineococcus* (Lewin *et al.*, 2016), les poumons et la peau des mammifères tels que *Mycobacterium* (Lewin *et al.*, 2016), et les racines et tissus internes des plantes tels que *Streptomyces* (Lewin *et al.*, 2016).

4. Taxonomie et critères de classification

La position exacte des actinomycètes dans le monde microbien a attiré une attention considérable et a fait l'objet de nombreuses spéculations. Ces organismes ont été classés comme champignons, comme bactéries et comme espèce spéciale groupe, soit dérivé de l'un des précédents, soit donnant lieu aux deux (Waksman, 1940).

4.1. Classification des actinomycètes

La deuxième édition du "*Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*" comprennent cinq volumes qui contiennent des noms et des descriptions des espèces bactériennes reconnues internationalement :

- Volume 1 (2001) : Les *Archaea* et les bactéries profondément ramifiées et phototrophes.
- Volume 2 (2005) : Les *Proteobacteria*.
- Volume 3 (2009) : Les *Firmicutes*.
- Volume 4 (2011) : Les *Bacteroidetes*, *Spirochaetes*, *Tenericutes (Mollicutes)*, *Acidobacteria*, *Fibrobactres*, *Fusobacteria*.
- Volume 5 (2012) : Les *Actinobacteria*.

Dans le volume 5, le phylum *Actinobacteria* est divisé en 6 classes, à savoir : *Actinobacteria*, *Acidimicrobiia*, *Coriobacteriia*, *Nitriliruptoria*, *Rubrobacteria* et *Thermoleophilia*. La classe *Actinobacteria* est subdivisée en 16 ordres, qui sont les *Actinomycetales*, les *Actinopolysporales*, les *Bifidobacteriales*, les *Catenulisporales*, les *Corynebacteriales*, les *Frankiales*, les *Glycomycetales*, les *Jiangellales*, les *Kineosporiales*, les *Micrococcales*, les *Micromonosporales*,

les *Propionibacteriales*, les *Pseudonocardiales*, les *Streptomycetales*, les *Streptosporangiales* et *Incertae sedis* (Chaudhary *et al.*, 2013).

4.2. Critères de classification des actinomycètes

La taxonomie des actinobactéries est basée sur un ensemble de caractères morphologiques, chimio taxonomiques et moléculaires.

4.2.1. Critères morphologiques

Les actinomycètes présentent une grande variété morphologique et de nombreux taxons plus largement étudiés (notamment les membres du genre *Streptomyces*) ont une forme végétative filamenteuse ramifiée qui ressemble aux hyphes fongiques bien que les actinomycètes ne soient pas des champignons. Les streptomycètes filamenteux représentent l'un des nombreux taxons bactériens appartenant à l'ordre taxonomique des *Actinomycetales*, qui comprend une diversité de morphotypes, notamment des cocci en forme de bâtonnets unicellulaires, des hyphes fragmentés et des mycéliums ramifiés (Zaitlin *et al.*, 2006).

4.2.2. Critères chimio taxonomiques

Les caractéristiques chimiotauxonomiques telles que les types de peptidoglycane, de ménaquinone, de phospholipides, de sucres et d'acides gras de la paroi cellulaire facilitent la délimitation phénotypique (tableau 1) (Embley *et al.*, 1994).

La présence d'isomères d'acide diaminopimélique (L ou méso) est l'une des propriétés les plus importantes de la paroi cellulaire (peptidoglycane) des bactéries à Gram-positives et des actinomycètes (Sharma *et al.*, 2014).

Tableau 1 : Différents types de composants de la paroi cellulaire chez les actinomycètes (Barka et al., 2016).

Type de paroi cellulaire	Constituant(s) pariétal(s) majeur(s)	Genres
I	ll-DAP, glycine, sans sucre	<i>Arachnia, Nocardioides, Pimelobacter, Streptomyces</i> <i>Arachnia, Nocardioides, Pimelobacter, Streptomyces</i>
II	Méso-DAP, glycine, arabinose, xylose	<i>Actinomyces, Actinoplanes, Ampulariella, Catellatosporia, Dactylosporangium, Glycomyces, Micromonospora</i>
III	Méso-DAP, madurose (3-O-méthyl-d-galactose)	<i>Actinocorallia, Actinomadura, Dermatophilus, Frankia, Geodermatophilus, Kitasatospora, Microbispora, Microtetrastpora, Nonomuraea, Planobispora, Planomonospora, Planotetrastpora, certains Frankia spp., Spirillospora, Streptosporangium, Thermoactinomyces, Thermomonospora</i>
IV	Méso-DAP, arabinose, galactose	<i>Micropolyspora, Nocardioformes</i>
V	Dépourvu de DAP ; possède de la lysine et de l'ornithine	<i>Actinomyces</i>
VI	Dépourvu de DAP ; présence variable d'acide aspartique, de galactose	<i>Arcanobacterium, Actinomyces, Microbacterium, Oerskovia, Promicromonospora</i>
VII	Dépourvu de DAP ; acide diaminobutyrique, glycine, avec lysine variable	<i>Agromyces, Clavibacter</i>
VIII	Dépourvu de DAP ; ornithine	<i>Aureobacterium, Curtobacterium, Cellulomonas</i>

DAP : acide diaminopimélique.

4.2.3. Critères moléculaires

Les nouvelles avancées, en particulier dans la systématique moléculaire, ont conduit à l'idée que les classifications, à tous les niveaux de la hiérarchie taxonomique, devrait être basée sur l'utilisation de données génotypiques et phénotypiques. Cette approche, connue sous le nom de taxonomie polyphasique, est devenue la pierre angulaire de la systématique procaryote (Nouioui *et al.*, 2018).

La classification des actinobactéries a évolué au fil du temps grâce à la disponibilité de connaissances et d'outils moléculaires existants (Salwan *et al.*, 2020). La figure 2 représente un arbre phylogénétique basé sur 97 séquences de génomiques d'espèces appartenant au phylum *Actinobacteria*.

5. Morphologie et cycle de développement

5.1. Morphologie

Les actinomycètes sont des bactéries à Gram-positives, aérobies, formant des spores, appartenant à l'ordre des Actinomycétales caractérisés par une croissance du mycélium du substrat et du mycélium aérien (Asma *et al.*, 2017).

Les Actinobactéries présentent une grande variété de morphologies, allant de cocci (*Micrococcus*) ou de formes en bâtonnets-coccoïde (par exemple, *Arthrobacter*) à des formes hyphales fragmentées (par exemple, *Nocardia* spp) ou à un mycélium ramifié permanent et hautement différencié (par exemple, *Streptomyces* spp) (Ventura *et al.*, 2007).

5.2. Cycle de développement

Les actinomycètes ont un cycle de développement complexe, il débute par la germination d'une spore, qui donne naissance à un mycélium primaire ou de substrat formé d'hyphes qui se ramifie. Le développement du mycélium du substrat vers la partie superficielle donne le mycélium "secondaire" ou aérien, les extrémités des hyphes aériens se différencient pour former des spores, qui sont des agents de dissémination (figure 3) (Boudjelal, 2012).

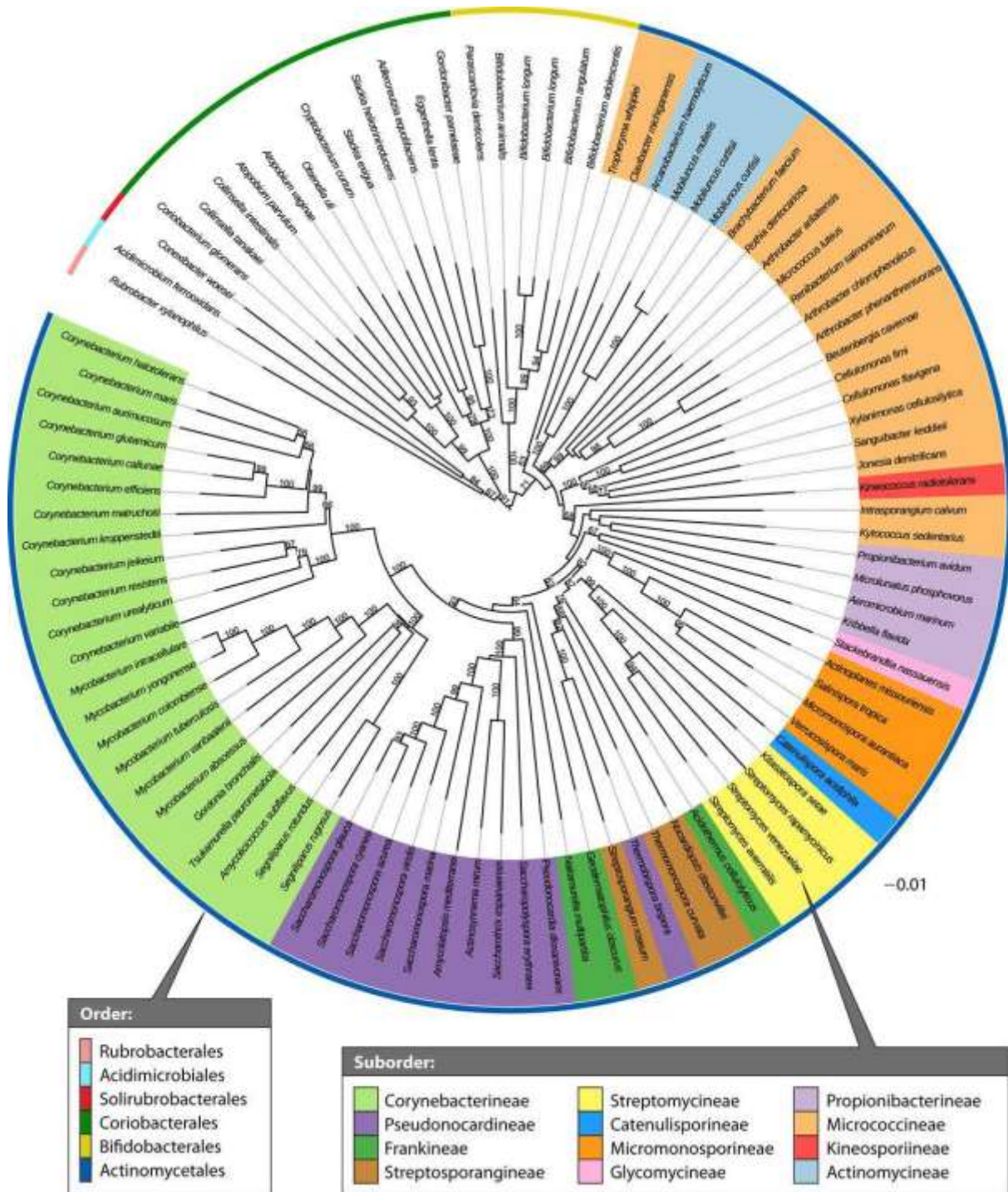


Figure 2 : Un arbre phylogénétique basé sur 97 séquences de génomiques d'espèces appartenant au phylum *Actinobacteria* (Mohammadipanah *et al.*, 2017).

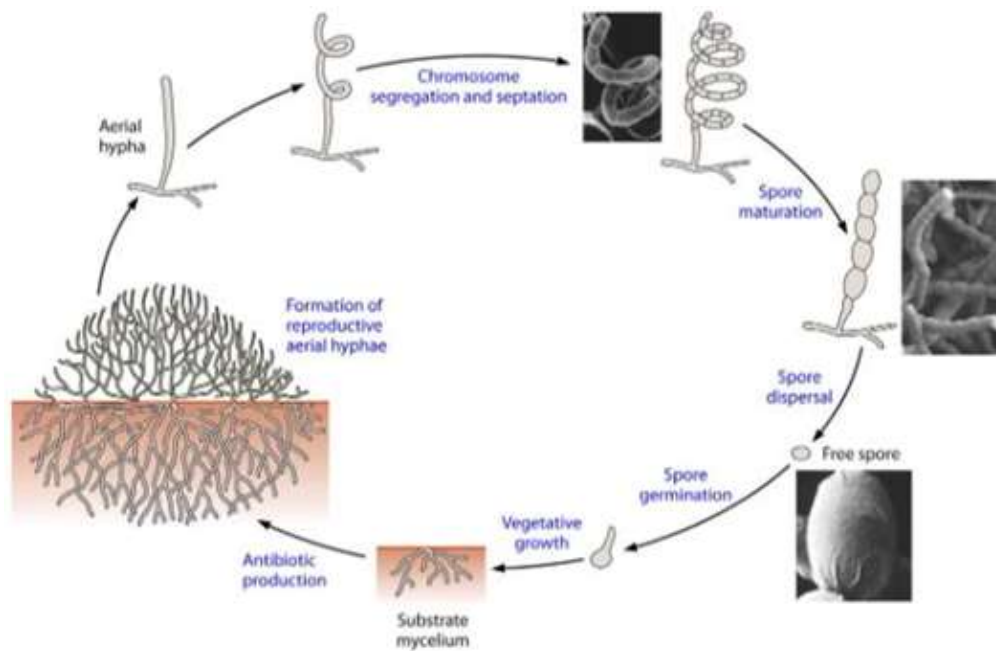


Figure 3 : Représentation schématique du cycle de vie des actinomycètes sporulants (Mohammadipanah *et al.*, 2017).

5.2.1. Mycélium primaire

Lorsqu'il est cultivé sur un substrat solide tel que la gélose, un réseau d'hyphes ramifiés formé par les actinomycètes se développe à la fois à la surface du substrat et à l'intérieur de celui-ci, formant un mycélium végétatif (Loucif *et al.*, 2017).

5.2.2. Mycélium secondaire

Le mycélium aérien, également appelé mycélium secondaire, est formé d'hyphes dressés sur le mycélium du substrat. Ces hyphes aériens sont plus épais et moins ramifiés que les hyphes matriciels, elles sont généralement colorées et entourés d'une enveloppe hydrophobe (Loucif *et al.*, 2017).

5.2.3. Formation des spores

La formation de spores est limitée au groupe morphologique des sporoactinomycètes, où la sporulation se produit dans des parties bien définies du mycélium. Les différents types de spores (figure 4) comprennent les endospores de *Thermoactinomyces*, les arthrospores caractéristiques de *Streptomyces*, les aleuriospores de *Micromonospora*, et les zoospores mobiles de divers membres des *Actinoplanaceae* ainsi que *Oerskovia*, *Geodermatophilus* et *Kitasatoa*. La formation de spores est influencée par différentes conditions de culture et un certain nombre de gènes différents (Hazarika *et al.*, 2020).

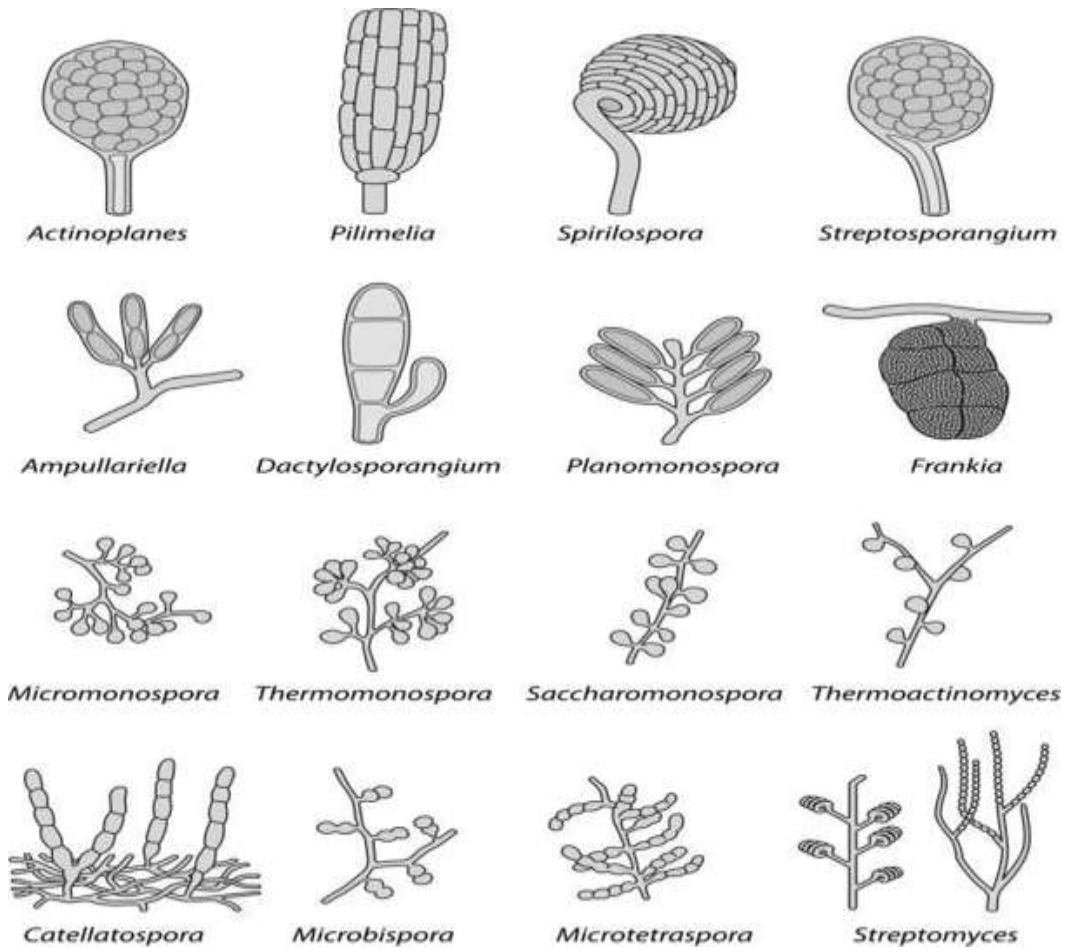


Figure 4 : Caractéristiques morphologiques des spores de différents genres d'actinobactéries (Mohammadipanah *et al.*, 2017).

1. Production d'enzymes à partir d'actinobactéries

Les actinobactéries font partie des producteurs de métabolites secondaires ayant un intérêt pharmacologique et commercial élevé, tels que les immunomodulateurs, les antibiotiques, les anticancéreuses (Muhanna *et al.*, 2021).

Les actinobactéries marines et terrestres produisent une large gamme d'enzymes biologiquement actives. Il s'agit de souches appartenant aux genres *Streptomyces*, *Nocardia* et *Nocardiopsis* qui ont manifesté des aptitudes intéressantes quant à la production des protéases, des cellulases, des lipases, des xylanases, des pectinases et des amylases. Ces enzymes sont d'une importance vitale dans les industries textiles et papetières, l'industrie alimentaire et la fermentation, en plus des applications biotechnologiques. D'autres enzymes comme l'uréase, la chitinase, la kératinase sont également produites à partir d'Actinobacteria. De même, les actinobactéries séparées des intestins de chèvre et de poulet ont révélé l'existence de nombreuses enzymes comme la lipase, la phytase, la protéase et l'amylase (Muhanna *et al.*, 2021). Le tableau 2 Représente une liste non-exhaustive des enzymes produites par les actinobactéries avec leur utilisation industrielle.

Tableau 2 : Liste des enzymes produites par les actinobactéries avec leur utilisation industrielle (Suriya *et al.*, 2016).

Enzyme	Producteur	Utilisation	Application dans l'industrie
Protéase	<i>Thermoactinomyces</i> sp., <i>Nocardiopsis</i> sp.,	Détergents pour la fabrication du fromage	Détergents alimentaires
	<i>Streptomyces</i>	Clarification—bière hypocalorique	Brassage
	<i>Hermoviolaceus</i>	Épilation	Cuir
Cellulase	<i>S. Thermobifida</i>	Enlèvement des taches. Assouplissement du coton	Détergent de textile
		Modification des fibres	Papier
Lipase	<i>S. griseus</i>	Enlèvement des taches Stabilité de la pâte et conditionnement	Détergents de pâtisserie
			Arôme de fromage
Xylanase	<i>Actinomadura</i> sp.	Digestibilité	Aliments pour animaux
			Booster de blanchiment
Pectinase	<i>S. lydicus</i>	Clarification, brassage	Boissons
Amylase	<i>S. erumpens</i>	Élimination des taches	Papier et Détergent de pulpe

Les enzymes actinobactériennes ont de nombreuses applications dans les industries et domaines médicaux. En général, les enzymes actinobactériennes sont plus stables et plus actives par rapport aux enzymes d'autres organismes ; en particulier ceux isolés d'écosystèmes extrêmes (Suriya *et al.*, 2016).

En général, les enzymes biologiquement actives peuvent être obtenues à partir de plantes, d'animaux et de micro-organismes. Les enzymes microbiennes ont été généralement favorisées pour leur isolement plus facile en haute quantités, leur production à faible coût en peu de temps et leur stabilité à diverses conditions extrêmes. Elles sont également plus contrôlables et moins nocives. Les enzymes qui sont sécrétées dans le milieu sont très fiables pour les procédés et applications industriels. De plus, la production et l'expression d'enzymes recombinantes sont également plus faciles avec des microbes comme cellule hôte. Les applications de ces enzymes comprennent la production chimique, la bioconversion et la bioremédiation. Concernant les applications industrielles, les études de purification enzymatique se sont principalement concentrées sur les protéases, les lipases et les amylases (Subash *et al.*, 2017).

2. La L- asparaginase

La L- asparaginase ou l'asparagine amino-hydrolase, c'est une enzyme de la famille des amidase, responsable de l'hydrolyse de L- asparagine en acide aspartique et ammoniac (figure 5). Elle a été identifiée pour la première fois par Clementi en 1922 (Muhanna *et al.*, 2021).

Il a été découvert que les actinobactéries étaient une bonne source de L-asparaginase. Il s'agit souvent de ceux isolés du sol, par exemple, *Nocardia* sp, *Streptomyces albidoflavus*, *S. griseus* et *Streptomyces karnatakensis* (Muhanna *et al.*, 2021).

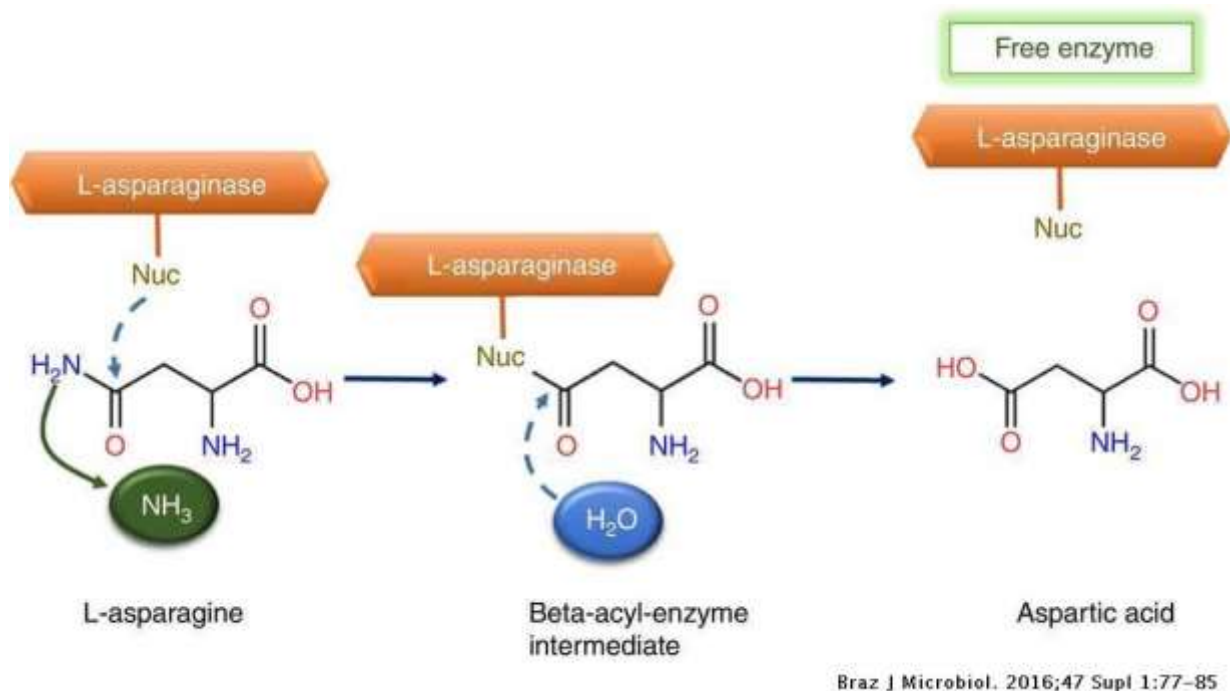


Figure 5 : Mécanisme général de la réaction de la L-asparaginase catalysée (Jorge *et al.*, 2016).

La source externe de la L-asparagine est nécessaire à la croissance des cellules tumorales alors que la croissance d'une cellule normale est indépendante de son exigence. En présence de L-asparaginase, les cellules tumorales sont ainsi privées d'un important facteur de croissance et ne peut pas survivre. Ceci fait de la L-asparaginase est un médicament enzymatique de choix, utilisé en thérapie combinée pour le traitement de la leucémie lymphoblastique (Chitranagada *et al.*, 2014).

Notamment, elle présente une grande importance dans les protocoles chimio-thérapeutiques de la leucémie aiguë lymphoblastique (LAL) et de la maladie de Hodgkin lymphomes. Les cellules cancéreuses, principalement les cellules lymphatiques, nécessitent une quantité élevée d'asparagine pour une croissance rapide et maligne. De cette façon, les cellules cancéreuses ont besoin de l'acide aminé apporté par l'alimentation (sanguine) ainsi que de cet acide aminé produit par eux-mêmes. Cependant, les lymphoblastes leucémiques et certaines autres cellules tumorales n'ont pas ou présentent une faible quantité de L-asparagine synthétase utilisée pour les synthèses de L-asparagine. Ainsi, ces cellules malignes sont dépendantes de la L-asparagine sanguine pour leur prolifération et leur survie. La L-asparaginase hydrolyse la L-asparagine sanguine, entraînant la mort des cellules tumorales par manque d'un facteur essentiel pour les protéines synthétases (apoptose dépendante) (figure 6). Cependant, les cellules saines ne sont pas affectées, car elles sont capables de produire la L-asparagine en utilisant la L-asparagine synthétase présente en quantité suffisante (Javier *et al.*, 2016).

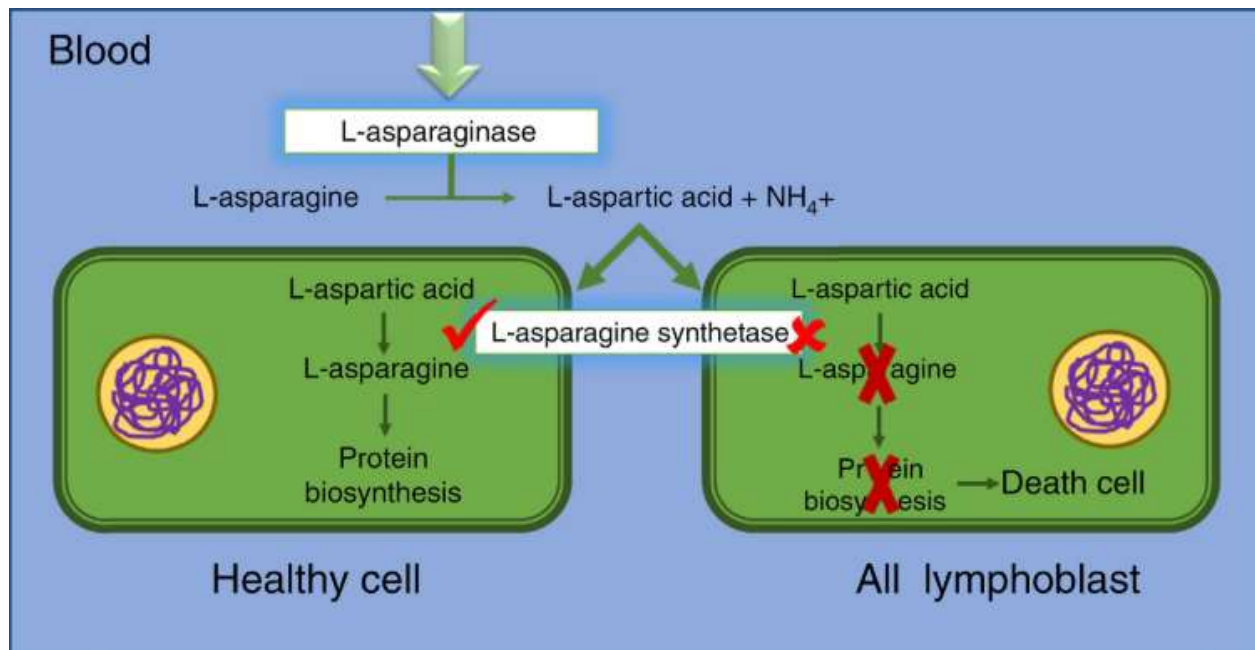


Figure 6 : Action antinéoplasique de la L-asparaginase (Jorge *et al.*, 2016).

La L-asparaginase a également un rôle important dans l'industrie alimentaire car elle réduit la formation de l'acrylamide (substance cancérogène) qui est le résultat de la réaction de Maillard entre l'acide aminé libre l'asparagine et le groupe carbonyle des sucres réducteurs comme le glucose. Plusieurs études montrent que la L-asparagine est le principal acide aminé responsable de la production d'acrylamide dans les aliments frais et cuits. Ce phénomène ne se produit pas dans les aliments bouillis. La réduction ou l'élimination est l'une des stratégies évaluées pour diminution de la quantité d'acrylamide dans les aliments. Pour la réduction de la L-asparagine, plusieurs options ont été étudiées, telles que :

- ✓ La sélection d'espèces végétales à faible teneur en L-asparagine dans leur composition est une approche visant à réduire la présence de cet acide aminé dans les plantes.
- ✓ La suppression d'enzymes spécifiques ou de gènes importants pour le contrôle de la biosynthèse de la L-asparagine.
- ✓ L'hydrolyse acide de la L-asparagine conduit à la formation d'acide aspartique et d'ammoniac, tandis que l'acétylation de la L-asparagine forme le N-acétyl-L-asparagine, empêchant ainsi la formation d'acrylamide (Jorge *et al.*, 2016).

Dans l'étude de Zyzak *et al.* (2003), les auteurs ont confirmé que l'utilisation de l'enzyme L-asparaginase avant de frire ou de cuire des aliments pourrait réduire le niveau d'acrylamide de plus de 99 % dans le produit final transformé. Ces dernières années, d'autres travaux ont traité

l'application de la L-asparaginase qui peut diminuer les effets négatifs des aliments contenant de l'acrylamide sans altérer leurs caractéristiques (Jorge *et al.*, 2016).

La L-asparaginase est largement distribué parmi les micro-organismes, la flore et la faune. Les microbes sont meilleures sources de L-asparaginase car ils peuvent être cultivés facilement et l'extraction et la purification de l'enzyme sont également pratiques, facilitant ainsi la production à grande échelle (Chitranagada *et al.*, 2014).

La L-asparaginase a également la capacité de catalyser d'autres réactions. Par exemple, la L-asparaginase produite par *Serratia marcescens* est capable d'hydrolyser 5% de la L-glutamine par rapport à l'hydrolyse de la L-asparaginase. Le même effet se produit à la L-asparaginase produite par *Escherichia coli* et *Erwinia chrysanthemi*. D'autres micro-organismes, tels que *Pseudomonas* sp. Et *Acinetobacter glutaminasificans*, synthétisent L-asparaginase avec des activités asparaginase et glutaminase égales. Dans certains cas, la L-asparaginase déclenche l'hydrolyse la L-glutamine seulement après conversion complète de la L-asparaginase en l'acide aspartique. En fait, la L-glutamine est un inhibiteur compétitif de l'hydrolyse de la L-asparagine. L'hydrolyse de la L-glutamine et de la L-asparagine sont similaires en raison de la similitude structurelle des deux acides aminés. Par conséquent, la plus grande partie de la L-asparaginase microbienne présente une activité glutaminase croisée, avec quelques exceptions telles que la L-asparaginase produite par *Wolinella succinogenes*, qui ne présentent pas d'activité L-glutaminase (Jorge *et al.*, 2016).

3. Amylase

Les amylases font partie d'un grand groupe d'enzymes glycosyl hydrolase qui catalysent la dégradation des glucides complexe. Il existe cinquante-sept familles de glycosides hydrolases qui ont été classées sur la base de leur fonction et leur spécificité. Il existe trois classes principales d'amylases :

- ✓ L' α -amylase se trouve chez les animaux, les plantes, les champignons et bactéries ;
- ✓ La β -amylase se trouve dans les graines de plantes, les bactéries et les champignons ;
- ✓ Et la γ -amylase se trouve dans la levure et champignons.

La fonction principale de toutes les amylases est dégradée l'amidon et les sucres ; cependant, il y a une différence dans leur structure et leur mode d'action. L' α -amylase clive de manière aléatoire le long de la chaîne d'amidon et à cause de cette non-spécificité, la digestion est plus rapide que les autres amylases (Ernest *et al.*, 2016).

Les β -amylases (EC 3.2.1.2), quant à elles, agissent également sur l'amidon, mais de manière moins efficace que les α -amylases. Elles clivent les liaisons glycosidiques β -1-4 de l'amidon, produisant principalement du maltose et de petites quantités de glucose. Contrairement aux α -amylases, les β -amylases ne sont pas capables de dégrader les liaisons glycosidiques α -1-4 présentes dans les oligosaccharides ramifiés. Les α -amylases sont généralement plus rapides que les β -amylases en raison de leur capacité à attaquer les liaisons glycosidiques α -1-4 dans l'amidon, qui sont plus faciles à cliver que les liaisons β -1-4. Cette différence d'activité est principalement attribuée à la structure et à la position du site actif des enzymes. Il convient également de mentionner que les α -amylases peuvent être d'origine animale ou végétale, tandis que les β -amylases sont généralement d'origine bactérienne ou fongique (Ernest *et al.*, 2016).

La production d'amylase à partir des bactéries est moins cher et plus rapide que d'autres micro-organismes. Une large gamme d'espèces bactériennes a été isolée pour la sécrétion d'amylase. La plupart sont des espèces de *Bacillus* (*B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis*, *B. coagulans*, *B. vulgaris*). D'autres espèces sont connues par leur production d'amylases telles que *Rhodothermus marinus*, *Corynebacterium gigantea*, *Chromohalobacter* sp. Les souches halophiles qui produisent des amylases comprennent : *Haloarcula hispanica*, *Halobacillus* sp., *Chromohalobacter* sp., *Bacillus dipsosauri* et *Halomonas meridiana* (Subash *et al.*, 2016).

3.1. L'importance d'amylase

3.1.1. Dans le domaine industriel

L'amylase représente environ 25% du marché mondial des enzymes. Elle est utilisée dans les aliments, les détergents, les produits pharmaceutiques, et les industries du papier et du textile. Ses applications dans l'industrie alimentaire comprennent la production du sirop de maïs, du sirop de maltose, du sirop de glucose et du jus. Elle a été utilisée comme additif alimentaire et pour la fabrication de détergents. Les amylases jouent également un rôle important dans le brassage de la bière et des boissons alcooliques à partir de sucres (à base d'amidon). Dans ce processus de fermentation, la levure est utilisée pour fermenter les sucres en alcool (Subash *et al.*, 2016).

Les industries de la détergence sont les premières consommatrices d'enzymes, tant en volume qu'en valeur. L'utilisation d'enzymes dans les formulations de détergents améliore la capacité des détergents à éliminer les taches tenaces et rend le détergent respectueux de l'environnement. Les amylases sont les deuxièmes types d'enzymes utilisées dans la formulation

de détergent enzymatique, et 90% de tous les détergents liquides contiennent ces enzymes (Mohsen *et al.*, 2012).

L'utilisation des α -amylases dans l'industrie des pâtes et papiers concerne la modification de l'amidon de papier couché. Le traitement de couchage sert à rendre la surface du papier suffisamment lisse et solide, pour améliorer la qualité d'écriture du papier (Mohsen *et al.*, 2012).

Les α -amylases seraient potentiellement utiles dans les industries pharmaceutiques si des enzymes aux propriétés appropriées pouvaient être préparées. À noter que la première enzyme produite industriellement (1894) était une amylase de source fongique, qui était utilisée comme aide pharmaceutique pour le traitement des troubles digestifs (Mohsen *et al.*, 2012).

3.1.2. Dans le domaine environnemental

L'amidon est un polysaccharide couramment trouvé dans la nature, principalement dans les plantes, où il sert de réserve d'énergie. Il est également présent en abondance dans les déchets issus de la transformation des matières premières végétales, tels que les résidus de l'industrie alimentaire ou de l'industrie du papier. La présence de ces déchets d'amidon en grande quantité peut entraîner des problèmes environnementaux, notamment la pollution des sols et de l'eau. Afin de purifier l'amidon extrait de ces déchets, diverses méthodes peuvent être utilisées, dont l'utilisation de micro-organismes ou de microbes produisant des enzymes amylolytiques (Mohsen *et al.*, 2012).

4. La caséinase

La caséine est la protéine majeure du lait (environ 90% de sa composition) et des produits laitiers. Elle a une grande valeur nutritionnelle. La caséinase, une exo enzyme naturelle sécrétée par plusieurs bactéries, hydrolyse la caséine et la convertit sous une forme soluble simple. Plusieurs groupes de bactéries sont connus pour leur capacité à libérer la caséinase en présence de caséine (Noor *et al.*, 2020).

Les protéases microbiennes offrent des avantages significatifs par rapport aux catalyseurs chimiques conventionnels en termes d'activité catalytique, degré élevé de spécificité de substrat et de capacité de production à grande échelle. Leur utilisation dans les processus industriels peut conduire à des économies de coûts, à des produits de haute pureté et à une plus grande durabilité environnementale (Noor *et al.*, 2020).

Les protéases sont utilisées pour diverses applications industrielles, tels que leur utilisation dans les détergents à lessive, dans l'industrie du cuir, l'industrie alimentaire, la biosynthèse des peptides ou des protéines spécifiques à des fins médicales ou industrielles. Les protéases sont utilisées comme ingrédients actifs dans le développement de produits biopharmaceutiques comme le nettoyant pour lentilles de contact et ils sont également efficaces pour nettoyer une grande variété de substrats protéiques polymères. Des protéases qui sont utilisés comme additifs dans les détergents doivent être stables et actifs en présence d'autres ingrédients détergents, tels que les agents tensioactifs, les adjuvants, les agents de blanchiment, les assouplissants ... (Subramani *et al.*, 2009).

Matériels et méthodes

1. L'écosystème étudié

Le prélèvement des échantillons de sol a été réalisé en Novembre 2022 à partir d'un site d'Ain Djaarir situé au niveau de la Wilaya de Khenchela (photo-satellite1).

Le bain immergé de Djarir est situé sur les pentes des montagnes de la zone forestière de Bouhamama, qui a un caractère pittoresque dans la wilaya de Khenchela (Site 1), et dont les coordonnées géographiques sont $35^{\circ}17'46.7''N$ et $6^{\circ}46'04.3''E$ en DMS (degrés, minutes, secondes) ou 35.296195 et 6.768089 (en degrés décimaux) (Site 2). Il est considéré comme la deuxième source naturelle permanente d'eau minérale chaude à valeur médicinale et sanitaire (Site internet 1) (Site 1).

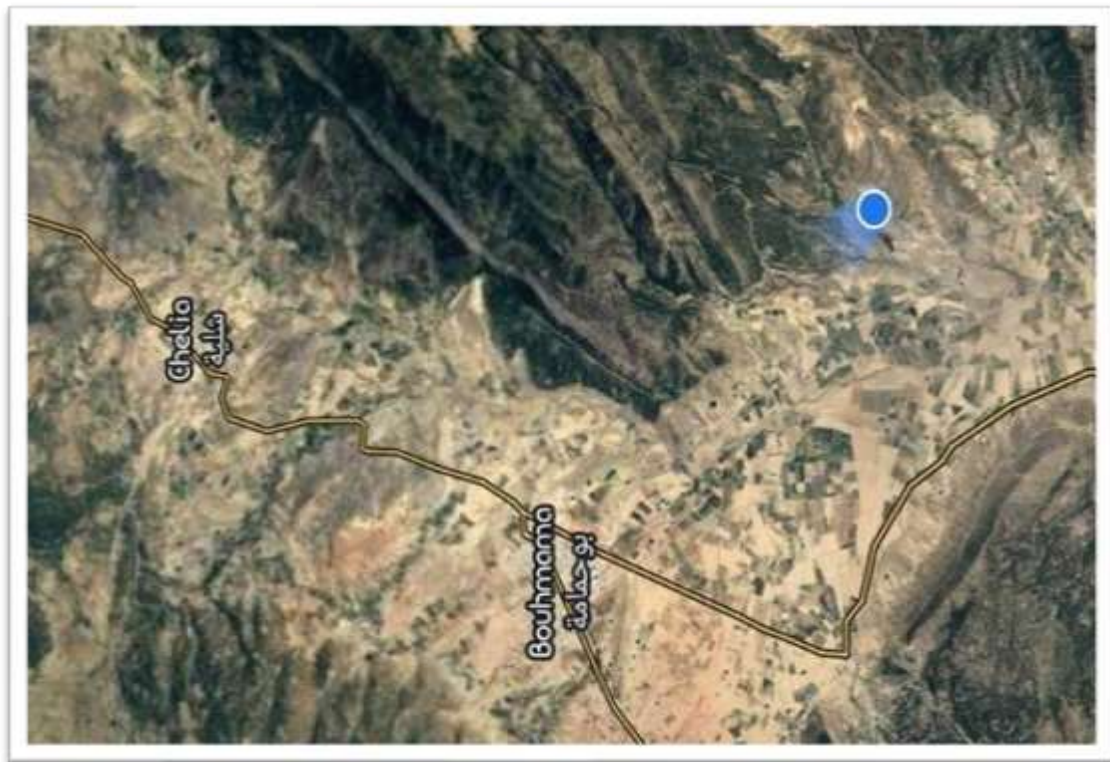


Figure 7 : La vue satellite du site Ain Djaarir (Khenchela) (Site internet 2).

1.1. Le prélèvement

Après avoir écarté les cinq premiers centimètres de sol à l'aide d'une spatule stérile, une quantité suffisante de terre est prélevée à une profondeur de 5 à 15 centimètres, puis déposée sur une feuille d'aluminium stérile. Suite à un premier tri écartant les pierres et les racines, l'échantillon est récupéré dans un flacon stérile et étiqueté. Les échantillons sont transportés au laboratoire pour être analysés (Djaballah, 2021).

2. Les analyses physicochimiques des échantillons de sol

Parmi les différentes analyses physico-chimiques du sol, nous nous sommes limités aux mesures de pH, de la conductivité électrique 1/5^{ème}, du pourcentage d'humidité et celui de la matière organique.

2.1. La mesure du pH

Une solution de sol (1/2,5 ; P/V) est préparée en mélangeant dix grammes de sol dans 25 ml d'eau distillée. Après 30 minutes d'agitation suivies de 20 minutes de repos, le pH est déterminé à l'aide d'un pH-mètre (Mathieu et Pieltain, 2003).

2.2. La mesure de la conductivité électrique (CE 1/5^{ème})

Une solution de sol (1/5^{ème}) est préparée en mélangeant vingt grammes (20g) de sol dans 100 ml d'eau distillée. Après une heure d'agitation suivie d'une demi-heure de repos, la suspension est décantée dans un bécher et la conductivité est mesurée à l'aide d'un conductimètre (Mathieu et Pieltain, 2003).

2.3. La mesure du pourcentage d'humidité

Cinq à dix grammes de sol sont séchés dans un four Pasteur réglé à une température de 105°C jusqu'à obtention d'un poids constant (Smith *et al.*, 1998 ; Mathieu et Pieltain, 2003). L'humidité du sol sera définie selon l'équation suivante :

$$\% H = \frac{PH-PS}{PH} \times 100$$

H : poids humide du sol. PS : poids sec du sol. % H : pourcentage d'humidité.

2.4. La mesure du pourcentage du carbone organique

Après évaporation de l'eau pour la mesure du pourcentage d'humidité, la matière organique contenue dans les échantillons du sol sec est incinérée dans un four à moufle à 450°C pendant 16 heures (Lee et Hwang, 2002 ; Mathieu et Pieltain, 2003). Le pourcentage de la matière organique est calculé selon l'équation suivante :

$$\% \text{ Matière organique} = \frac{\text{Poids du sol avant calcination} - \text{Poids du sol après calcination}}{\text{Poids du sol avant calcination}} \times 100$$

3. L'isolement de la microflore du sol

3.1. Milieux d'isolement

Afin de procéder à l'isolement des actinomycètes, nous avons utilisé les milieux de culture ISP2 (*International Streptomyces Project 2*), ISP4 et ISP5, additionnés chacun de 5%, 7,5% et 10% d'NaCl (annexe) (Shirling et Gottlieb, 1966).

3.2. La préparation des dilutions

Pour chaque échantillon, 2g de sol sont déposés dans un tube à essai contenant 18 ml d'eau physiologique stérile, puis agités au vortex à haute vitesse pendant 5 minutes. Cette suspension est considérée comme étant la suspension mère et représente la dilution 10^{-1} . Une série de dilutions est ensuite effectuée pour chaque échantillon de sol jusqu'à la dilution 10^{-3} .

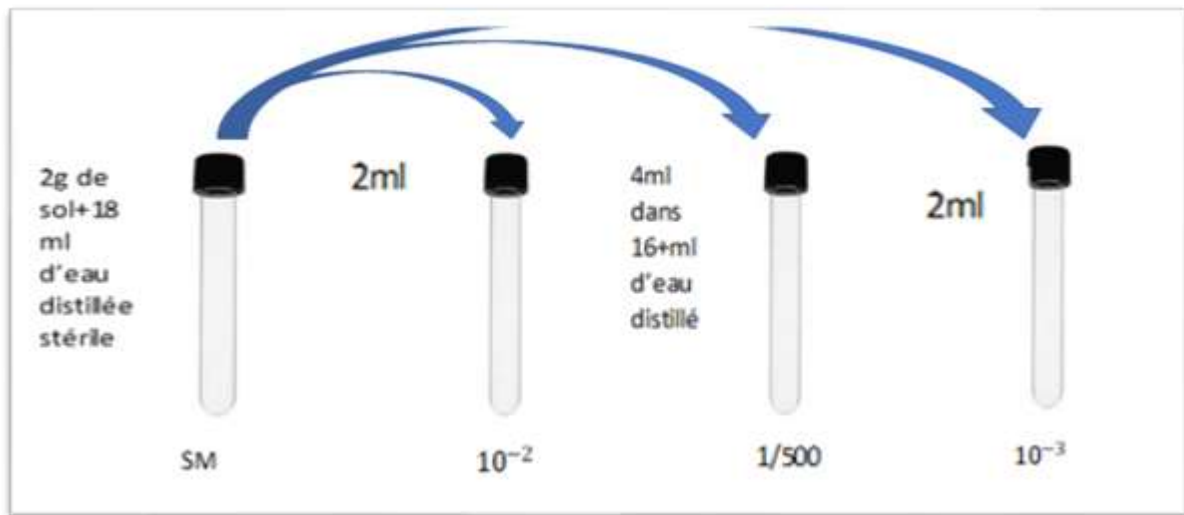


Figure 8 : Un schéma illustrant la méthode de préparation des solutions diluées.

3.3. L'ensemencement et l'incubation

Pour isoler les actinomycètes, nous avons utilisé 3 milieux de culture différents, auxquels nous avons ajouté respectivement 5 %, 7,5 % et 10 % de chlorure de sodium (NaCl) : ISP2 (*International Streptomyces Project 2*), ISP4 et ISP5.

Des solutions de sol de chaque échantillon sont préparées en mélangeant 2g de sol dans 18 ml d'eau physiologique stérile et agitées vigoureusement au Vortex pendant 5 min. À partir de cette dilution 10^{-1} , les dilutions 10^{-2} , $1/500$, et 10^{-3} sont préparées, les boîtes sont incubées à 30°C pendant 15 jours avec une observation quotidienne.

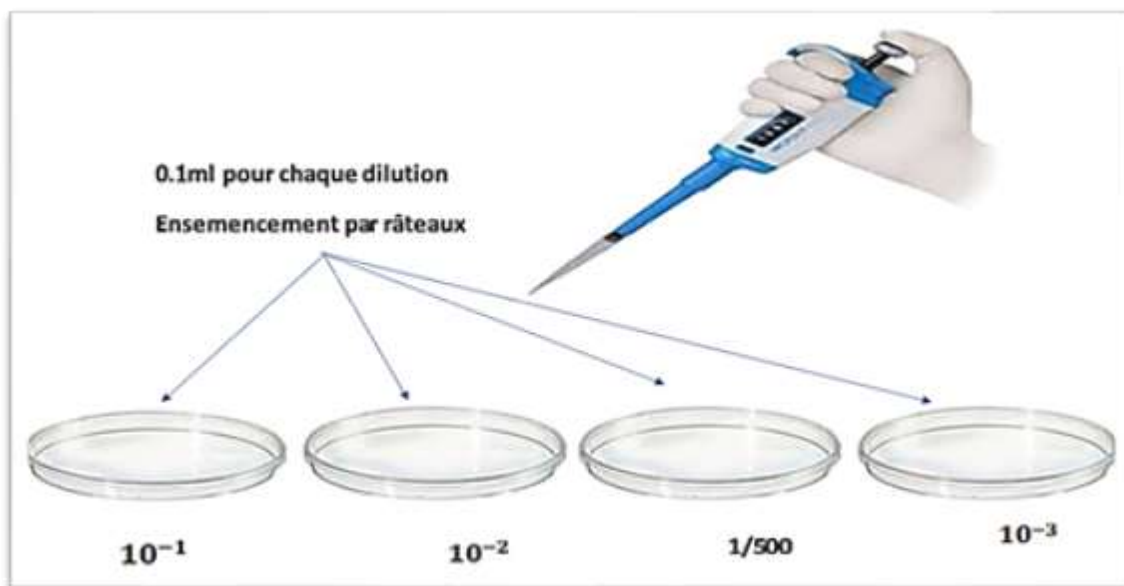


Figure 9 : Un schéma illustrant la méthode d'isolement.

3.4. Dénombrement des souches

Les colonies des moisissures et bactéries présentant ou pas l'aspect des Actinomycètes filamenteux (colonies dures incrustées dans la gélose constituée d'hyphes Suite à une observation directe sous microscope optique à l'objectif $\times 3,2$) sont comptées après 21 jours d'incubation (Djaballah, 2021).

Après ce comptage, un dénombrement est réalisé en utilisant la formule :

$$N \text{ (UFC/g)} = (nc) \times (1/Ve) \times (1/d)$$

nc : nombre de colonies ; Ve= volume d'ensemencement (0,1 ml) ; d : la dilution prise en compte

3.5. Analyse statistique des données de dénombrement

Cette analyse a été effectuée grâce à la version 24.0 du logiciel *IBM SPSS Statistics Premium Grad Pack*. Elle doit passer par le test de normalité de la distribution. Ce test est considéré comme une étape carrefour qui nous permettra de discerner la nature des tests statistiques utiliser, paramétriques ($p > 0,05$) ou non-paramétriques ($p \leq 0,05$) (Djaballah, 2021).

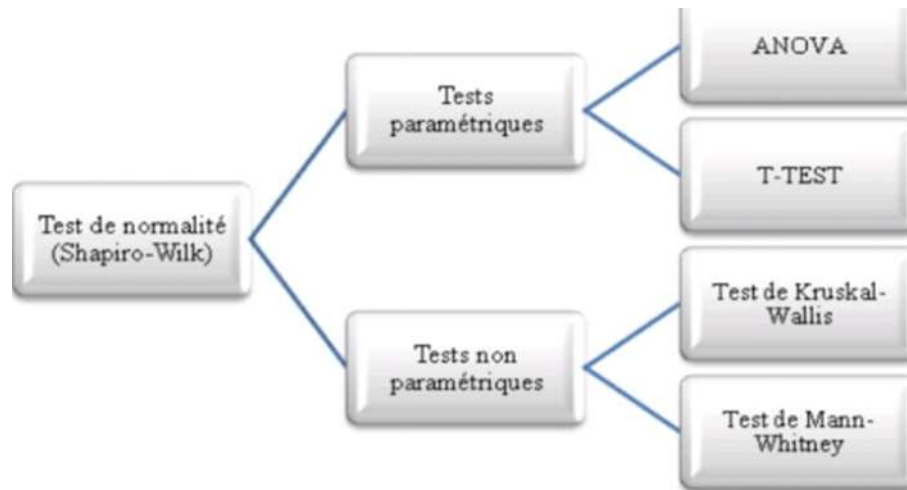


Figure 10 : Schéma représentatif des tests empruntés lors de l'analyse statistique.

4. Purification des souches

Les colonies des actinomycètes sont délicatement prélevées etensemencées par la méthode des quatre quadrants sur leurs milieux d'isolement respectifs, puis incubées à 30°C pendant 14 jours (Djaballah, 2021).

5. Conservations des souches

La méthode consiste à ajouter une suspension de cellules ou de conidies à un sol stérile, à sécher le mélange à température ambiante puis à le conserver au réfrigérateur à 4°C (Martin, 1964).

6. Le test d'halophilie et d'halotolérance

Cette étape permet de sélectionner les souches d'actinomycètes halophiles et halotolérantes. Les cultures pures d'actinomycètes sont prélevées etensemencées en surface sur le milieu d'isolement respectif exempt de NaCl. Celles qui ont la capacité de croître en absence de NaCl sont considérées comme des halotolérantes alors que celles qui ne croissent pas sont des halophiles (Djaballah, 2010).

7. Etude des caractères macroscopiques

L'étude des caractères cultureux est basée sur la description des colonies (la croissance, la couleur, la forme et la taille des colonies, production de la masse sporale, production de pigments...) sur les milieux de culture ISP2, ISP4, ISP5 (Shirling et Gottlieb, 1966) additionnés de 5%, 7,5% et 10% de NaCl (Djaballah, 2021).

8. Mise en évidence des activités enzymatiques

8.1. Recherche de la L-asparaginase

Le test a été réalisé sur la gélose M9 modifiée (Annexe). Le milieu est coulé dans des boîtes de Pétri puisensemencé par stries des souches à tester et incubé à 30°C. La dégradation de la L-asparagine se manifeste par une coloration rose autour des colonies. La lecture s'est faite du 3^{ème} jour et s'est poursuivie jusqu'au 10^{ème} jour d'incubation.

8.2. Recherche d'amylase

Ce test est réalisé en cultivant les souches d'actinomycètes à tester sur milieu de culture ISP4(Annex). Après 21 jours d'incubation à 30°C, la gélose est recouverte d'une solution de Lugol. L'hydrolyse est mise en évidence par l'absence de coloration autour des colonies. À l'inverse, les zones contenant de l'amidon se colorent en brun.

8.3. Recherche de caséinase

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

8.4. Action sur le lait écrémé

Des tubes contenant une solution de lait écrémé et de milieu ISP5 liquide exempte de l'asparagine additionnée de 5% d'NaCl sontensemencés et incubés à 30°C. Des observations régulières pendant 14 jours permettent de noter la coagulation ou la peptonisation du lait provoquée par les souches à testées.

Résultats et discussion

1. Les analyses physico-chimiques

Les résultats des analyses physicochimiques des échantillons du site Ain Djaarir sont représentés dans le tableau 3.

Tableau 3 : Les résultats de différentes analyses physicochimiques.

Échantillon	pH	%H	C. org (%)	C.1/5 ^{ème} (mS/cm)
EA1	7,62	5,77	11,50	12,25
EA2	7,45	10,47	12,2	5,43
EA3	7,45	6,72	11,60	14,53

%H : Le pourcentage d'humidité. % C. org. : Le pourcentage du carbone organique. C.1/5^{ème} : La conductivité du sol diluée au 1/5^{ème}.

1.1. Le pH des échantillons du sol

Selon Baize (2000), le « Référentiel Pédologique » propose sept domaines de pH avec leurs qualificatifs correspondants du sol qui sont représenté dans le tableau 4.

Tableau 4 : La classification des sols en fonction de leur pH.

Intervalle du pH	Horizon du sol
pH inférieur à 3,5	Hyper-acide
pH entre 3,5 et 4,2	Très acide
pH entre 4,2 et 5,0	Acide
pH entre 5,0 et 6,5	Peu acide
pH entre 6,5 et 7,5	Neutre
pH entre 7,5 et 8,7	Basique
pH supérieur à 8,7	Très basique

Nous pouvons constater que le pH de l'échantillon EA1, EA3 est entre 6,5 et 7,5, ce qui nous permet de les classer comme neutre. Cependant, le pH de l'échantillon EA2 est entre 7,5 et 8,7, ce qui nous permet de le classer comme basique.

1.2. La conductivité des échantillons du sol

Selon Mathieu et Pieltain (2003), les sols peuvent être classés sur la base de leur conductivité. Cette classification est représentée dans le tableau 5.

Résultats et discussion

Tableau 5 : Les classes de la salinité du sol en fonction de la conductivité électrique de l'extrait aqueux à 25°C (Richards, 1969).

	Non salé	Peu salé	Salé	Très salé	Extrêmement salé
C. ex 1/5 (mS/cm)	< 0,6	0,6 – 1,2	1,2 – 2,4	2,4 – 6	> 6
Salure (méq / 100 g de sol)	< 3	3 – 6	6 – 12	12 – 30	> 30

C. ex 1/5 : conductivité de l'extrait aqueux 1/5^{ème} ; mS : milli Siemens.

D'après cette classification, nous constatons que la conductivités électriques 1/5ème de l'échantillons EA1 et EA3 supérieures à 6mS/cm, ce qui nous permet de conclure que les échantillons de sol sont extrêmement salins, alors que la conductivité électriques 1/5ème de l'échantillons EA2 comprise entre 2,4-6ms/cm, ce qui nous permet de conclure que l'échantillon de sol est très salin. À noter que le sol d'Ain Djaarir possède des conductivités comprises et largement supérieures à la limite (6mS/cm) pour laquelle un sol donné peut être considéré comme très salin et extrêmement salin, ce qui reflète son très haute salinité.

À cause des valeurs de pH et de conductivité retrouvées lors de l'analyse des échantillons de sols, nous prévoyons non seulement la présence des halophiles et des halotolérants mais aussi des microorganismes alcalophiles et alcalotolérants. Pour cette raison, nous avons ajusté le pH des milieux de culture à 8,0, et additionné, différentes concentrations d'NaCl (5%, 7,5% et 10%) aux milieux d'isolement.

1.3. Le pourcentage de l'humidité

Le tableau 6 représente la classification des sols en fonction de leur taux d'humidité.

Tableau 6 : La classification des sols en fonction du taux d'humidité (Lee et Hwang, 2002).

Taux D'humidité	Intervalle du pourcentage d'humidité (%)
Faible	2,00 – 9,00
Modéré	9,10 – 13,00
Élevé	13,10 – 20,00

Résultats et discussion

En se basant sur la classification de Lee et Hwang (2002), nous constatons que le taux d'humidité de l'échantillon EA1, EA3 est compris entre 2% et 9% tandis que l'échantillon EA2 est comprise entre 9% et 13%. Par conséquent, les échantillons EA1 et EA3 ont des taux d'humidité faibles par contre l'échantillon EA2 a un taux d'humidité modéré.

1.4. Le pourcentage du carbone organique

Le tableau 7 représente la classification des sols en fonction de leur taux du carbone organique.

Tableau 7 : La classification des sols en fonction du taux du carbone organique (Lee et Hwang, 2002).

Taux du carbone organique	Intervalle du pourcentage du carbone organique
Faible	4,00 – 7,00
Modéré	7,10 – 9,00
Élevé	9,10 – 11,00

Selon la classification de Lee et Hwang (2002), les résultats obtenus nous permettent de conclure que le taux du carbone organique du sol des trois échantillons EA1, EA2 et EA3 est élevé vu qu'il est compris entre 9,10% et 11%.

2. Isolement des actinomycètes

Une observation microscopique (objectif x 3,2) réalisée sur chaque isolat nous a permis de détecter les actinomycètes reconnus par leur aspect filamenteux. Les figures 11 et 12 représentent l'aspect macroscopique et microscopique des colonies d'actinomycètes.

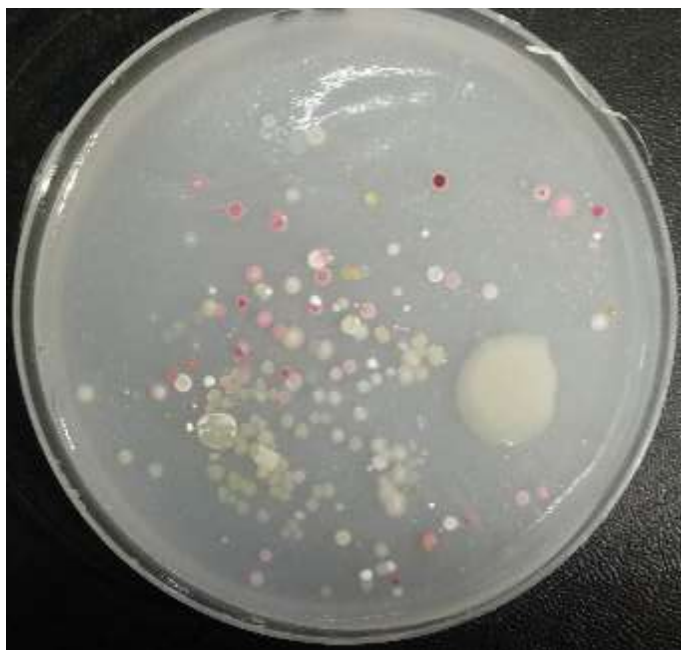


Figure 11 : Photographie représentant les résultats de l'isolement d'actinomycètes sur le milieu ISP4 additionné de 7,5% d'NaCl.

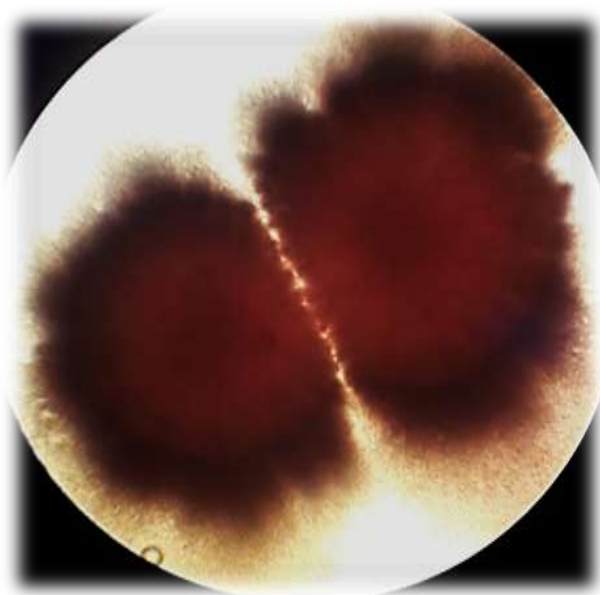


Figure 12 : Photographie de l'aspect filamenteux des colonies d'actinomycètes sous microscope optique (Objectif x 3,2).

3. Dénombrement de la flore Actinomycétales

Les résultats du dénombrement de la flore actinomycètes isolée à partir des échantillons du site Ain Djaarir sur les milieux ISP2, ISP4 et ISP5 additionnés de 5%, 7,5% et 10% d'NaCl sont représentés dans le tableau 8.

Résultats et discussion

Tableau 8 : Dénombrement de la flore actinomycètes isolée à partir des échantillons du site Ain Djaarir.

Échantillon	Charge d'actinomycètes (x10 ³ UFC/g)								
	ISP2			ISP4			ISP5		
	5%	7,5%	10%	5%	7,5%	10%	5%	7,5%	10%
EA1	0	50	2,6	76	70	103	7,3	3,8	35
EA2	17,3	72	1.5	163	85	210	105	37	90
EA3	38	62	76	36	40	360	40	3,2	130

À partir des résultats présentés dans le tableau 8, nous remarquons la présence d'une flore actinomycètes dans les trois échantillons EA1, EA2 et EA3. Sur l'ensemble des conditions d'isolement utilisées (27 conditions), nous avons pu isoler cette flore dans 96,29% des cas.

3.1. Effet de l'échantillon sur les résultats de dénombrement des actinomycètes

Les résultats présentés dans le tableau 8 montrent des différences entre les charges actinomycètes isolés à partir des trois échantillons :

- Dans le cas du milieu ISP2 additionné de 5% d'NaCl, la charge d'actinomycète isolée à partir de l'échantillon EA3 est 2 fois supérieure à celle isolé de l'échantillon EA2.
- Dans le cas du milieu ISP2 additionné de 10% d'NaCl :
 - La charge d'actinomycète isolée à partir de l'échantillon EA3 est 50 fois supérieure à celle isolé de l'échantillon EA2 ;
 - La charge d'actinomycète isolée à partir de l'échantillon EA3 est 29 fois supérieure à celle isolé de l'échantillon EA1.
- Dans le cas du milieu ISP4 additionné de 5% d'NaCl :
 - La charge d'actinomycète êtes isolé à partir de l'échantillon EA2 est 2 fois supérieure à celle isolé de l'échantillon EA1 ;
 - La charge d'actinomycète isolée à partir de l'échantillon EA2 est 4 fois supérieure à celle isolé de l'échantillon EA3.
- Dans le cas du milieu ISP4 additionné de 10% d'NaCl, la charge d'actinomycète isolée à partir de l'échantillon EA3 est 3 fois supérieure à celle isolé de l'échantillon EA1.

Résultats et discussion

- Dans le cas du milieu ISP5 additionné de 5% d'NaCl, la charge d'actinomycète isolée à partir de l'échantillon EA2 est 14 fois supérieure à celle isolée de l'échantillon EA1 et plus que 2 fois supérieure à celle isolée de l'échantillon EA3.
- Dans le cas du milieu ISP5 additionné de 10% d'NaCl :
 - La charge d'actinomycète isolée à partir de l'échantillon EA3 est 3 fois supérieure à celle isolée de l'échantillon EA1 ;
 - La charge d'actinomycète isolée à partir de l'échantillon EA2 est 2 fois supérieure à celle isolée de l'échantillon EA1.

L'ensemble de ses observations nous permettent de supposer la présence d'un effet de l'échantillon sur les résultats de dénombrement des actinomycètes.

De ce fait, nous allons procéder à une analyse statistique pour confirmer ou infirmer l'effet de l'échantillon sur les résultats de dénombrement des actinomycètes.

3.2. Analyse statistique sur effet de l'échantillon du sol

a. Tests de normalité

Les hypothèses

H_0 : les variables sont distribuées selon la loi normale.

H_1 : les variables ne sont pas distribuées selon la loi normale.

La règle de décision

$P > 0,05$: H_0 est non rejetée $P \leq 0,05$: H_0 est rejetée

Deux tests de normalité, présentés dans le tableau 9, ont été réalisés sur les résultats de dénombrement des actinomycètes isolés à partir de trois échantillons EA1, EA2 et EA3. Il s'agit des tests de Kolmogorov-Smirnov et Shapiro-Wilk pour lesquels les seuils de signification respectifs sont de 0,200 et 0,05.

Tableau 9 : Tests de normalité Shapiro-Wilk et Kolmogorov-Smirnov de la distribution de résultats de dénombrement d'actinomycètes isolés à partir trois échantillons EA1, EA2 et EA3.

Échantillon	Kolmogorov-Smirnov			Shapiro-Wilk		
	Statistiques	ddl	Sig.	Statistiques	ddl	Sig.
EA1	,239	9	,148	,886	9	,182
EA2	,171	9	,200	,949	9	,678
EA3	,319	9	,009	,669	9	,001

Sig : valeur de signification. ddl : degré de liberté.

Résultats et discussion

Selon les résultats présentés dans le tableau 9, il apparaît que les valeurs de significations, obtenues pour la distribution des charges des actinomycètes isolées à partir de l'échantillon EA3 sont inférieures aux seuils de significations de Kolmogorov-Smirnov et Shapiro-Wilk. De ce fait, nous rejetons l'hypothèse H0 ; le test paramétrique ANOVA ne peut être appliqué pour étudier l'effet de l'échantillon sur la charge d'actinomycètes isolée. Il sera remplacé par le test non paramétrique de Kruskal-Wallis.

b. Test de Kruskal Wallis

Les rangs moyens des valeurs de dénombrement d'actinomycètes isolés sur l'échantillon EA1, EA2 et EA3 sont représentés dans le tableau 10. Ce test est appliqué sur les rangs moyens, calculés par ce même test, des valeurs de dénombrement d'actinomycètes sur les trois échantillons.

Tableau 10 : Les rangs moyens des valeurs de dénombrement d'actinomycètes isolés à partir des échantillons EA1, EA2 et EA3.

Échantillon	N	Rang moyen
EA1	9	11,61
EA2	9	15,56
EA3	9	14,83
Total	27	

Les hypothèses

H0 : les trois rangs moyens sont égaux ($rm_1=rm_2=rm_3$).

H1 : il existe au moins deux rangs moyens différents.

Les résultats du test Kruskal Wallis appliqués sur les rangs moyens d'actinomycètes isolés des échantillons de sol EA1, EA2 et EA3 sont représentés dans le tableau 11.

Tableau 11 : Valeurs de significations asymptotiques bilatérales obtenues de l'application du test Kruskal Wallis sur la distribution d'actinomycètes isolés à partir des échantillons EA1, EA2 et EA3.

	Actinomycète
Khi-deux	1,261
ddl	2
Sig. Asymptotique	,532

ddl : degré de liberté.

D'après les résultats représentés dans le tableau 11, nous constatons que la valeur de signification asymptotique obtenue est supérieure au seuil de signification 0,05, ce qui nous permet d'accepter l'hypothèse H0 qui stipule que les rangs moyens sont égaux. Nous

concluons qu'il n'y a pas des différences significatives entre les charges d'actinomycètes isolées depuis les trois échantillons EA1, EA2 et EA3. Donc, les échantillons utilisés n'ont pas un effet quantitativement significatif sur les actinomycètes isolés.

3.3. Effet du milieu de culture sur les résultats de dénombrement des actinomycètes

Une comparaison grossière entre les milieux de culture et leur efficacité vis-à-vis de l'isolement des actinomycètes des trois échantillons de sol dévoilent que :

- À partir de l'échantillon EA1 et sur la concentration 10% d'NaCl :
 - La charge d'actinomycètes isolée sur le milieu ISP4 est 39 fois supérieure à celle isolée sur le milieu ISP2 ;
 - La charge d'actinomycètes isolée sur le milieu ISP5 est 13 fois supérieure à celle isolée sur le milieu ISP2.

- À partir de l'échantillon EA2 et sur la concentration 10% d'NaCl
 - La charge d'actinomycètes isolée sur le milieu ISP4 est 140 fois supérieure à celle isolée sur le milieu ISP2 ;
 - La charge d'actinomycètes isolée sur le milieu ISP5 est 60 fois supérieure à celle isolée sur le milieu ISP2.

L'ensemble de ces observations nous permettent de supposer la présence d'un effet du milieu de culture.

3.4. Analyse statistique sur effet de milieu de culture

a. Test de normalité

Les hypothèses

H0 : les variables sont distribuées selon la loi normale.

H1 : les variables ne sont pas distribuées selon la loi normale.

La règle de décision

$P > 0,05$: H0 est non rejetée

$P \leq 0,05$: H0 est rejetée

Deux tests de normalité, présentés dans le tableau 12, ont été réalisés sur les résultats de dénombrement des actinomycètes isolés à partir de trois milieux de culture ISP2, ISP4 et ISP5.

Résultats et discussion

Il s'agit des tests de Kolmogorov-Smirnov et Shapiro-Wilk pour lesquels les seuils de signification respectifs sont de 0,200 et 0,05.

Tableau 12 : Tests de normalité Shapiro-Wilk et Kolmogorov-Smirnov de la distribution des charges d'actinomycètes isolés sur les milieux de culture ISP2, ISP4 et ISP5.

Milieu de culture	Kolmogorov-Smirnov			Shapiro-Wilk		
	Statistiques	ddl	Sig.	Statistiques	Ddl	Sig.
ISP2	,211	9	,200	,875	9	,138
ISP4	,258	9	,086	,823	9	,037
ISP5	,208	9	,200	,934	9	,523

Selon les résultats présentés dans le tableau 12, il apparaît que la valeur de signification obtenue pour la distribution des charges des actinomycètes isolées à partir du milieu de culture ISP4 est inférieure aux seuils de significations de Kolmogorov-Smirnov et Shapiro-Wilk. De ce fait, nous rejetons l'hypothèse H₀ ; le test paramétrique ANOVA ne peut pas être appliqué pour étudier l'effet de milieu de culture sur la charge d'actinomycètes isolée. Il sera remplacé par le test non paramétrique de Kruskal-Wallis.

b. Test de Kruskal-Wallis

Les rangs moyens des valeurs de dénombrement d'actinomycètes isolés sur les milieux de culture ISP2, ISP4 et ISP5 sont représentés dans le tableau 13. Ce test est appliqué sur les rangs moyens, calculés par ce même test, des valeurs de dénombrement d'actinomycètes sur les trois milieux de culture.

Tableau 13 : Les rangs moyens des valeurs de dénombrement d'actinomycète sur les milieux de culture ISP2, ISP4 et ISP5.

Milieu de culture	N	Rang moyen
ISP2	9	8,61
ISP4	9	19,56
ISP5	9	13,83
Total	27	

Les hypothèses

H₀ : les trois rangs moyens sont égaux ($r_{m1}=r_{m2}=r_{m3}$).

H₁ : il existe au moins deux rangs moyens différents.

Les résultats de test Kruskal Wallis appliqués sur les rangs moyens d'actinomycètes isolés depuis les milieux de culture ISP2, ISP4 et ISP5 sont représentés dans le tableau 14.

Résultats et discussion

Tableau 14 : Valeurs de significations asymptotiques bilatérales obtenues de l'application du test Kruskal Wallis sur la distribution d'actinomycètes isolé sur les milieux de culture ISP2, ISP4 et ISP5.

	Actinomycètes
Khi-deux	8,567
ddl	2
Signification asymptotique	,014

ddl : degré de liberté.

D'après les résultats représentés dans le tableau 14, nous constatons que la valeur de signification asymptotique obtenue est inférieure au seuil de signification 0,05, ce qui nous permet de refuser l'hypothèse H0 qui stipulée que les rangs moyens sont égaux. Nous concluons qu'il y a des différences significatives entre les charges d'actinomycètes isolées sur les milieux de culture ISP2, ISP4 et ISP5. Donc, il existe un effet du milieu de culture sur le nombre d'actinomycètes isolés.

Une comparaison deux-à-deux devient donc nécessaire afin de déterminer le ou les milieux de culture les plus favorables à l'isolement d'actinomycètes. Pour cela, nous devons appliquer le test non paramétrique de Mann-Whitney.

c. Test de Mann-Whitney

Les hypothèses

H0 : les trois rangs moyens sont égaux ($rm1=rm2=rm3$).

H1 : il existe au moins deux rangs moyens différents.

La règle de décision

$P > 0,05$: H0 est non rejetée

$P \leq 0,05$: H0 est rejetée

Les résultats du test de Mann-Whitney appliqué sur les rangs moyens de la flore Actinomycétales isolés sur les trois milieux de culture ISP2, ISP4 et ISP5 sont représentés dans le tableau 15.

Tableau 15 : Valeurs de significations asymptotiques bilatérales obtenues de l'application du test Mann-Whitney sur la distribution d'actinomycètes isolés sur les milieux de culture (ISP2 et ISP4), (ISP2 et ISP5) et (ISP4 et ISP5).

	ISP2 / ISP4	ISP2 / ISP5	ISP4 / ISP5
U de Mann-Whitney	11,500	24,000	22,500
W de Wilcoxon	56,500	69,000	67,500
Z	-2,562	-1,457	-1,590
Sig. Asymptotique (bilatérale)	,010	,145	,112

D'après les résultats représentés dans le tableau 15, nous constatons que la valeur de signification asymptotique bilatérale obtenue est inférieure au seuil de signification 0,05, ce qui nous permet de refuser l'hypothèse H0 qui stipulée que les deux rangs moyens sont Égaux. Nous concluons qu'il y a une différence significative entre les charges de la flore actinomycète isolée sur le milieu de culture ISP2 par rapport à celle isolée sur le milieu de culture ISP4.

La charge de la flore actinomycètes isolée sur le milieu de culture ISP4 est significativement supérieure à celle isolée sur le milieu de culture ISP2. Donc, le milieu de culture ISP4 est plus favorable à l'isolement d'actinomycètes que le milieu de culture ISP2.

D'après les résultats représentés dans le tableau 15, nous constatons que la valeur de signification asymptotique bilatérale obtenue pour les comparaisons ISP2/ISP5 et ISP4/ISP5 est supérieure au seuil de signification 0,05, ce qui nous permet d'accepter l'hypothèse H0 qui stipulée que les deux rangs moyens sont égaux. Nous concluons qu'il n'y a pas des différences significatives entre les charges de la flore actinomycète isolée sur le milieu de culture ISP2 par rapport à celle isolée sur le milieu de culture ISP5. De même, il n'y a pas des différences significatives entre les charges de la flore actinomycète isolée sur le milieu de culture ISP4 par rapport à celle isolée sur le milieu de culture ISP5.

3.5. Effet de la concentration d'NaCl sur les résultats de dénombrement des actinomycètes

Les résultats présentés dans le tableau 8 montrent des différences entre les charges actinomycètes isolés à partir des trois échantillons :

- À partir de l'échantillon EA2 et sur le milieu ISP2 :
 - La charge d'actinomycètes isolée à 7,5% d'NaCl est 48 fois supérieure à celle isolée sur 10% d'NaCl ;
 - La charge d'actinomycètes isolée à 5% d'NaCl est 11 fois supérieure à celle isolée sur 10% d'NaCl.

- À partir de l'échantillon EA3 et sur le milieu ISP5 :
 - La charge d'actinomycètes isolée à 10% d'NaCl est 40 fois supérieure à celle isolée sur 7,5% d'NaCl ;
 - La charge d'actinomycètes isolée à 5% d'NaCl est 12 fois supérieure à celle isolée sur 7,5% d'NaCl.

Résultats et discussion

L'ensemble de ces observations nous permettent de supposer la présence d'un effet de la concentration d'NaCl sur les résultats de dénombrement des actinomycètes.

3.6. Analyse statistique sur effet de la concentration d'NaCl

a. Test de normalité

Les hypothèses

H0 : les variables sont distribuées selon la loi normale.

H1 : les variables ne sont pas distribuées selon la loi normale.

La règle de décision

$P > 0,05$: H0 est non rejetée $P \leq 0,05$: H0 est rejetée

Deux tests de normalité, présentés dans le tableau 16, ont été réalisés sur les résultats de dénombrement des actinomycètes isolés sur les concentrations 5%, 7,5% et 10% d'NaCl. Il s'agit des tests de Kolmogorov-Smirnov et Shapiro-Wilk pour lesquels les seuils de signification respectifs sont de 0,200 et 0,05.

Tableau 16 : Tests de normalité Shapiro-Wilk et Kolmogorov-Smirnov de la distribution de résultats des charges actinomycètes isolés à 5%, 7,5% et 10% d'NaCl.

NaCl	Kolmogorov-Smirnova			Shapiro-Wilk		
	Statistiques	ddl	Sig.	Statistiques	ddl	Sig.
5%	,218	9	,200	,923	9	,418
7,5%	,194	9	,200	,920	9	,392
10%	,215	9	,200	,869	9	,119

Sig : valeur de signification ddl : degré de liberté.

Selon les résultats présentés dans le tableau 16, il apparaît que les valeurs de signification obtenues pour la distribution des charges des actinomycètes isolées sur les trois concentrations d'NaCl 5%, 7,5% et 10% sont supérieures aux seuils de significations de Kolmogorov-Smirnov et Shapiro-Wilk, De ce fait, nous acceptons l'hypothèse H0 ; le test paramétrique ANOVA peut être appliqué pour étudier l'effet d'NaCl sur la charge d'actinomycètes isolée.

b. Test ANOVA

Les moyens des valeurs de dénombrement d'actinomycètes isolés sur les trois concentrations d'NaCl 5%, 7,5% et 10%, sont représentés dans le tableau 17. Ce test est appliqué sur les rangs moyens, calculés par ce même test, des valeurs de dénombrement d'actinomycètes sur les trois concentrations d'NaCl.

Résultats et discussion

Tableau 17 : Les moyens des valeurs de dénombrement de la d'actinomycètes isolés à 5%, 7,5% et 10% d'NaCl.

NaCl	Moyenne	N	Ecart type
5%	60922,22	9	49918,228
7,5%	39800,00	9	30120,923
10%	112011,11	9	113688,505
Total	70911,11	27	77311,907

Les hypothèses

H0 : les trois moyens sont égaux ($m_1=m_2=m_3$).

H1 : il existe au moins deux moyens différents.

Les résultats de test ANOVA appliqués sur les moyens d'actinomycètes isolés sur les trois concentrations d'NaCl 5%, 7,5% et 10% sont représentés dans le tableau 18.

Tableau 18 : Les résultats de test ANOVA appliqués sur les moyens d'actinomycètes isolés à 5%, 7,5% et 10% d'NaCl.

	Somme des carrés	ddl	Carré moyen	F	Sig.
Inter-groupes	24812002220,000	2	12406001110,000	2,280	,124
Intragroupes	130593404400,000	24	5441391852,000		
Total	155405406700,000	26			

D'après les résultats représentés dans le tableau 18, nous constatons que la valeur de signification obtenue est supérieure au seuil de signification 0,05, ce qui nous permet d'accepter l'hypothèse H0 qui stipulée que les moyens sont égaux. Nous concluons qu'il n'y a pas des différences significatives entre les charges d'actinomycètes isolées depuis les trois concentrations d'NaCl. Donc, les concentrations d'NaCl 5%, 7,5% et 10% utilisés n'ont pas un effet quantitativement significatif sur les actinomycètes isolés.

4. Dénombrement de la flore Bactérienne

Les résultats du dénombrement de la flore bactérienne isolée à partir des échantillons du site Ain Djaarir sur les milieux ISP2, ISP4 et ISP5 additionnés de 5%, 7,5% et 10% d'NaCl sont représentés dans le tableau 19.

Résultats et discussion

Tableau 19 : Dénombrement de la flore bactérienne à partir des échantillons du site Ain Djaair.

Échantillon	Charge des Bactéries (x10 ⁵ UFC/g)								
	ISP2			ISP4			ISP5		
	5%	7,5%	10%	5%	7,5%	10%	5%	7,5%	10%
EA1	0,98	7,5	3	3,6	7,55	1	20,5	1,2	13
EA2	11,15	1,9	1,45	1,67	1,9	0,153	2	5,75	0,146
EA3	0,18	1,93	0,1	0,213	0,214	0,6	10	18	13

À partir des résultats présentés dans le tableau 19, nous remarquons la présence d'une charge bactérienne dans les trois échantillons EA1, EA2 et EA3. Toutes les conditions d'isolement utilisées sont favorables pour isoler la flore bactérienne.

4.1. Effet de l'échantillon sur les résultats de dénombrement des bactéries

Les résultats mettent également en évidence la présence d'une flore bactérienne riche dans les trois échantillons de sol qui a pu croître sur les trois milieux de culture.

À partir des résultats présentés dans le tableau 19, nous remarquons que :

- Dans le cas du milieu ISP2 additionné de 7,5% d'NaCl :
 - La flore bactérienne isolée à partir de l'échantillon EA1 est 3 fois supérieure à celle isolée de l'échantillon EA2 ;
 - La flore bactérienne isolée à partir de l'échantillon EA1 est 3 fois supérieure à celle isolée de l'échantillon EA3.

- Dans le cas du milieu ISP2 additionné de 10% d'NaCl :
 - La flore bactérienne isolée à partir de l'échantillon EA1 est 2 fois supérieure à celle isolée de l'échantillon EA2 ;
 - La flore bactérienne isolée à partir de l'échantillon EA1 est 30 fois supérieure à celle isolée de l'échantillon EA3.

- Dans le cas du milieu ISP4 additionné de 7,5% d'NaCl :
 - La flore bactérienne isolée à partir de l'échantillon EA1 est 3 fois supérieure à celle isolée de l'échantillon EA2 ;

Résultats et discussion

- La flore bactérienne isolée à partir de l'échantillon EA1 est 35 fois supérieure à celle isolée de l'échantillon EA2.
- Dans le cas du milieu ISP4 additionné de 7,5% d'NaCl, la flore bactérienne isolée à partir de l'échantillon EA1 est 6 fois supérieure à celle isolée de l'échantillon EA2.
- Dans le cas du milieu ISP5 additionné de 7,5% d'NaCl :
 - La flore bactérienne isolée à partir de l'échantillon EA3 est 15 fois supérieure à celle isolée de l'échantillon EA1 ;
 - La flore bactérienne isolée à partir de l'échantillon EA3 est 3 fois supérieure à celle isolée de l'échantillon EA2.
- Dans le cas du milieu ISP5 de 10% d'NaCl, la flore bactérienne isolée à partir de l'échantillon EA1 est 89 fois supérieure à celle isolée de l'échantillon EA2.

L'ensemble de ses observations nous permettent de supposer la présence d'un effet de l'échantillon sur les résultats de dénombrement des bactéries non filamenteuses.

De ce fait, nous allons procéder à une analyse statistique pour confirmer ou infirmer l'effet de l'échantillon sur les résultats de dénombrement des bactéries.

4.2. Analyse statistique sur effet de l'échantillon du sol

a. Test de normalité

Les hypothèses

H0 : les variables sont distribuées selon la loi normale.

H1 : les variables ne sont pas distribuées selon la loi normale.

La règle de décision

$P > 0,05$: H0 est non rejetée

$P \leq 0,05$: H0 est rejetée

Deux tests de normalité, présentés dans le tableau 20, ont été réalisés sur les résultats de dénombrement de la flore bactérienne isolée à partir de trois échantillons EA1, EA2 et EA3. Il s'agit des tests de Kolmogorov-Smirnov et Shapiro-Wilk pour lesquels les seuils de signification respectifs sont de 0,200 et 0,05.

Résultats et discussion

Tableau 20 : Tests de normalité Shapiro-Wilk et Kolmogorov-Smirnov de la distribution de résultats de dénombrement des bactéries isolées à partir trois échantillons EA1, EA2 et EA3.

Échantillon	Kolmogorov-Smirnova			Shapiro-Wilk		
	Statistiques	ddl	Sig.	Statistiques	ddl	Sig.
EA1	,224	9	,200	,833	9	,048
EA2	,380	9	,000	,726	9	,003
EA3	,334	9	,005	,743	9	,004

Sig : valeur de signification, ddl : degré de liberté.

Selon les résultats présentés dans le tableau 20, il apparaît que les valeurs de significations, obtenues pour la distribution des charges de la flore bactérienne isolée à partir des trois échantillons EA1, EA2 et EA3 sont inférieures aux seuils de significations de Kolmogorov-Smirnov et Shapiro-Wilk. De ce fait, nous rejetons l'hypothèse H0 ; le test paramétrique ANOVA ne peut pas être appliqué pour étudier l'effet de l'échantillon sur la charge bactérienne isolée. Il sera remplacé par le test non paramétrique de Kruskal Wallis.

b. Test de Kruskal Wallis

Les rangs moyens des valeurs de dénombrement de la flore bactériennes isolées sur les échantillons EA1, EA2 et EA3 sont représentés dans le tableau 21. Ce test est appliqué sur les rangs moyens calculés par ce même test, des valeurs de dénombrement de la flore bactérienne sur les trois échantillons.

Tableau 21 : Les rangs moyens des valeurs de dénombrement de la flore bactérienne isolées à partir des échantillons EA1, EA2 et EA3.

Echantillon	N	Rang moyen
EA1	9	17,17
EA2	9	12,56
EA3	9	12,28
Total	27	

Les hypothèses

H0 : les trois rangs moyens sont égaux ($rm1=rm2=rm3$).

H1 : il existe au moins deux rangs moyens différents.

Les résultats du test de Kruskal Wallis appliqué sur les rangs moyens de la flore bactérienne isolée à partir des échantillons EA1, EA2 et EA3 sont représentés dans le tableau 22.

Tableau 22 : Valeurs de significations asymptotiques bilatérales obtenues de l'application du test Kruskal Wallis sur la distribution de la flore bactérienne isolée à partir des trois échantillons.

	Bactéries
Khi-deux	2,156
ddl	2
Sig. Asymptotique	,340

D'après les résultats représentés dans le tableau 22, nous constatons que la valeur de signification asymptotique obtenue est supérieure au seuil de signification 0,05, ce qui nous permet d'accepter l'hypothèse H0 qui stipulée que les rangs moyens sont égaux. Nous concluons qu'il n'y a pas des différences significatives entre les charges de la flore bactérienne isolées depuis les échantillons EA1, EA2 et EA3. Donc, les échantillons utilisés n'ont pas un effet quantitativement significatif sur la flore bactérienne isolée.

4.3. Effet du milieu de culture sur les résultats de dénombrement des bactéries

Une comparaison grossière entre les milieux de culture et leur efficacité vis-à-vis de la charge bactérienne des trois échantillons de sol dévoilent que :

- À partir de l'échantillon EA1 et sur la concentration 5% d'NaCl :
 - La charge bactérienne isolée sur le milieu ISP5 est 5 fois supérieure à celle isolée sur le milieu ISP4 ;
 - La charge bactérienne isolée sur le milieu ISP5 est 20 fois supérieure à celle isolée sur le milieu ISP2.

- À partir de l'échantillon EA2 et sur la concentration 5% d'NaCl :
 - La charge bactérienne isolée sur le milieu ISP2 est 6 fois supérieure à celle isolée sur le milieu ISP4 ;
 - La charge bactérienne isolée sur le milieu ISP2 est 5 fois supérieure à celle isolée sur le milieu ISP5.

- À partir de l'échantillon EA3 et sur la concentration 7,5% d'NaCl :
 - La charge bactérienne isolée sur le milieu ISP5 est 84 fois supérieure à celle isolée sur le milieu ISP4 ;
 - La charge bactérienne isolée sur le milieu ISP5 est 9 fois supérieure à celle isolée sur le milieu ISP2.

L'ensemble de ses observations nous permettent de supposer la présence d'un effet du milieu de culture sur les résultats de dénombrement des bactéries.

4.4. Analyse statistique sur effet de milieu de culture

a. Test de normalité

Les hypothèses

H0 : les variables sont distribuées selon la loi normale.

H1 : les variables ne sont pas distribuées selon la loi normale.

La règle de décision

$P > 0,05$: H0 est non rejetée

$P \leq 0,05$: H0 est rejetée

Deux tests de normalité, présentés dans le tableau 23, ont été réalisés sur les résultats de dénombrement de la flore bactérienne isolée sur les trois milieux de cultures ISP2, ISP4 et ISP5. Il s'agit des tests de Kolmogorov-Smirnov et Shapiro-Wilk pour lesquels les seuils de signification respectifs sont de 0,200 et 0,05.

Tableau 23 : Tests de normalité Shapiro-Wilk et Kolmogorov-Smirnov de la distribution de résultats de dénombrement des bactéries isolées sur les milieux ISP2, ISP4 et ISP5.

Milieu de culture	Kolmogorov-Smirnova			Shapiro-Wilk		
	Statistiques	ddl	Sig.	Statistiques	ddl	Sig.
ISP2	,293	9	,025	,778	9	,012
ISP4	,274	9	,050	,752	9	,006
ISP5	,169	9	,200	,927	9	,457

Sig : valeur de signification. ddl : degré de liberté.

Selon les résultats présentés dans le tableau 23, il apparaît que les valeurs de significations, obtenues pour la distribution des charges de la flore bactérienne isolées à partir des trois milieux de cultures ISP2 et ISP4 sont inférieures aux seuils de significations de Kolmogorov-Smirnov et Shapiro-Wilk. De ce fait, nous rejetons l'hypothèse H0 ; le test paramétrique ANOVA ne peut pas être appliqué pour étudier l'effet de milieu de culture sur la charge bactérienne isolée. Il sera remplacé par le test non paramétrique de Kruskal Wallis.

b. Test de Kruskal Wallis

Les rangs moyens des valeurs de dénombrement de la flore bactériennes sur les trois milieux de culture sont représentés dans le tableau 24. Ce test est appliqué sur les rangs moyens calculés par ce même test, des valeurs de dénombrement de la flore bactérienne sur les trois milieux de culture.

Résultats et discussion

Tableau 24 : Les rangs moyens des valeurs de dénombrement des bactéries isolées depuis les milieux de culture ISP2, ISP4 et ISP5.

Milieu de culture	N	Rang moyen
ISP2	9	12,50
ISP4	9	10,50
ISP5	9	19,00
Total	27	

Les hypothèses

H0 : les trois rangs moyens sont égaux ($\mu_1=\mu_2=\mu_3$).

H1 : il existe au moins deux rangs moyens différents.

Les résultats du test de Kruskal Wallis appliqué sur les rangs moyens de la flore bactérienne isolée sur les milieux de culture ISP2, ISP4 et ISP5 sont représentés dans le tableau 25.

Tableau 25 : Valeurs de significations asymptotiques bilatérales obtenues de l'application du test Kruskal Wallis sur la distribution des bactéries isolées sur les milieux de culture ISP2, ISP4 et ISP5.

	Bactéries
Khi-deux	5,646
ddl	2
Sig. Asymptotique	,059

D'après les résultats représentés dans le tableau 25, nous constatons que la valeur de signification asymptotique obtenue est proche au seuil de signification 0,05, ce qui nous permet de refuser l'hypothèse H0 qui stipulée que les rangs moyens sont égaux. Malgré cela, nous allons procéder à une comparaison deux-à-deux entre les rangs moyens obtenus sur le milieu de culture ISP2, ISP4 et ISP5. Pour cela, nous devons appliquer le test non paramétrique de Mann-Whitney.

c. Test de Mann-Whitney

Les hypothèses

H0 : les trois rangs moyens sont égaux ($\mu_1=\mu_2=\mu_3$).

H1 : il existe au moins deux rangs moyens différents.

La règle de décision

$P > 0,05$: H0 est non rejetée

$P \leq 0,05$: H0 est rejetée

Résultats et discussion

Les résultats du test de Mann-Whitney appliqué sur les rangs moyens de la flore bactérienne isolés sur les trois milieux de culture ISP2, ISP4 et ISP5 sont représentés dans le tableau 26.

Tableau 26 : valeurs de significations asymptotiques bilatérales obtenues de l'application du test Mann-Whitney de la distribution de la flore bactérienne isolées sur les milieux de culture (ISP2 et ISP4), (ISP2 et ISP5) et (ISP4 et ISP5).

	ISP2/ISP4	ISP2/ISP5	ISP4/ISP5
U de Mann-Whitney	33,500	20,000	16,000
W de Wilcoxon	78,500	65,000	61,000
Z	-0,618	-1,811	-2,165
Sig. Asymptotique (Bilatérale)	0,536	0,070	0,030

D'après les résultats représentés dans le tableau 26, nous constatons que la valeur de signification asymptotique bilatérale obtenue est inférieure au seuil de signification 0,05, ce qui nous permet de refuser l'hypothèse H0 qui stipulée que les deux rangs moyens sont égaux. Nous concluons qu'il y a une différence significative entre les charges de la flore bactérienne isolée sur le milieu de culture ISP4 par rapport à celle isolée sur le milieu de culture ISP5.

La charge de la flore bactérienne isolée sur le milieu de culture ISP5 est significativement supérieure à celle isolée sur le milieu de culture ISP4. Donc, le milieu de culture ISP5 est plus favorable à l'isolement de la flore bactérienne que le milieu de culture ISP4.

D'après les résultats représentés dans le tableau 26, nous constatons que la valeur de signification asymptotique bilatérale obtenue pour les comparaisons ISP2/ISP4 et ISP2/ISP5 est supérieure au seuil de signification 0,05, ce qui nous permet d'accepter l'hypothèse H0 qui stipulée que les deux rangs moyens sont égaux. Nous concluons qu'il n'y a pas des différences significatives entre les charges de la flore bactérienne isolée sur le milieu de culture ISP2 par rapport à celle isolée sur le milieu de culture ISP4. De même, il n'y a pas des différences significatives entre les charges de la flore actinomycète isolée sur le milieu de culture ISP2 par rapport à celle isolée sur le milieu de culture ISP5.

4.5. Effet de la concentration d'NaCl sur les résultats de dénombrement des bactéries

Les résultats présentés dans le tableau 19 montrent des différences entre les charges bactérienne isolés à partir des trois échantillons :

- À partir de l'échantillon EA2 et sur le milieu ISP2, la charge bactérienne isolée à 5% d'NaCl est 7 fois supérieure à celle isolée sur 10% d'NaCl.
- À partir de l'échantillon EA1 et sur le milieu ISP4 :

Résultats et discussion

- La charge bactérienne isolée à 7,5% d'NaCl est 7 fois supérieure à celle isolée sur 10% d'NaCl ;
- La charge bactérienne isolée à 5% d'NaCl est 3 fois supérieure à celle isolée sur 10% d'NaCl.

L'ensemble de ses observations nous permettent de supposer la présence d'un effet de la concentration d'NaCl sur les résultats de dénombrement des bactéries.

4.6. Analyse statistique sur effet de la concentration d'NaCl

a. Test de normalité

Les hypothèses

H0 : les variables sont distribuées selon la loi normale.

H1 : les variables ne sont pas distribuées selon la loi normale.

La règle de décision

$P > 0,05$: H0 est non rejetée

$P \leq 0,05$: H0 est rejetée

Deux tests de normalité, présentés dans le tableau 27, ont été réalisés sur les résultats de dénombrement de la flore bactérienne isolée à partir de trois concentrations d'NaCl 5%, 7,5% et 10%. Il s'agit des tests de Kolmogorov-Smirnov et Shapiro-Wilk pour lesquels les seuils de signification respectifs sont de 0,200 et 0,05.

Tableau 27 : Tests de normalité Shapiro-Wilk et Kolmogorov-Smirnov de la distribution de résultats des charges bactériennes isolées à 5%, 7,5% et 10% d'NaCl.

NaCl	Kolmogorov-Smirnova			Shapiro-Wilk		
	Statistiques	ddl	Sig.	Statistiques	ddl	Sig.
5%	,280	9	,041	,795	9	,018
7.5%	,271	9	,055	,790	9	,016
10%	,322	9	,008	,659	9	,000

Sig : valeur de signification. ddl : degré de liberté.

Selon les résultats présentés dans le tableau 27, il apparaît que les valeurs de significations, obtenues pour la distribution des charges de la flore bactérienne isolées à partir des trois concentrations d'NaCl, sont inférieures aux seuils de significations de Kolmogorov-Smirnov et Shapiro-Wilk. De ce fait, nous rejetons l'hypothèse H0 ; le test paramétrique ANOVA ne peut pas être appliqué pour étudier l'effet de la concentration d'NaCl sur la charge bactérienne isolée. Il sera remplacé par le test non paramétrique de Kruskal Wallis.

b. Test de Kruskal Wallis

Les rangs moyens des valeurs de dénombrement de la flore bactériennes isolée sur les trois concentrations d'NaCl 5%, 7,5% et 10% sont représentés dans le tableau 28. Ce test est appliqué sur les rangs moyens, calculés par ce même test, des valeurs de dénombrement de la flore bactérienne isolée sur les trois concentrations d'NaCl.

Tableau 28 : Les rangs moyens des valeurs de résultats de dénombrement de la flore bactérienne à 5%, 7,5% et 10% d'NaCl.

NaCl	N	Rang moyen
5%	9	15,00
7,5%	9	16,00
10%	9	11,00
Total	27	

Les hypothèses

H0 : les trois rangs moyens sont égaux ($rm1=rm2=rm3$).

H1 : il existe au moins deux rangs moyens différents.

Les résultats du test de Kruskal Wallis appliqué sur les rangs moyens de la flore bactérienne isolée sur les trois concentrations d'NaCl 5%, 7,5% et 10% sont représentés dans le tableau 29.

Tableau 29 : valeurs de significations asymptotiques bilatérales obtenues de l'application du test Kruskal Wallis sur la distribution de résultats de dénombrement de la flore bactérienne isolée à 5%, 7,5% et 10% d'NaCl.

	Bactéries
Khi-deux	2,001
ddl	2
Sig. Asymptotique	,368

D'après les résultats représentés dans le tableau 29, nous constatons que la valeur de signification asymptotique obtenue est supérieure au seuil de signification 0,05, ce qui nous permet d'accepter l'hypothèse H0 qui stipulée que les rangs moyens sont égaux. Nous concluons qu'il n'y a pas des différences significatives entre les charges de la flore bactérienne isolées depuis les trois concentrations d'NaCl 5%, 7,5%. Donc, les concentrations utilisées n'ont pas un effet quantitativement significatif sur la flore bactérienne isolées.

5. Dénombrement de la flore fongique

Les résultats du dénombrement de la flore fongique isolée à partir des échantillons du site Ain Djarir sur les milieux ISP2, ISP4 et ISP5 additionnés de 5%, 7,5% et 10% d'NaCl sont représentés dans le tableau 30.

Résultats et discussion

Tableau 30 : Dénombrement de la flore fongique à partir des échantillons du site Ain Djaairir.

Échantillon	Charge fongique ($\times 10^3$ UFC/g)								
	ISP2			ISP4			ISP5		
	5%	7,5%	10%	5%	7,5%	10%	5%	7,5%	10%
EA1	50	14	8	0,1	2,6	42	2	10	2,8
EA2	70	13	10	15	5	0,1	19	100	10
EA3	0,9	110	20	21	0,6	6	12	1,1	0,9

5.1. Effet de l'échantillon sur les résultats de dénombrement de la flore fongique

À partir des résultats présentés dans le tableau 30, nous remarquons la présence d'une charge fongique dans les trois échantillons EA1, EA2 et EA3. Toutes les conditions d'isolement utilisées sont favorables pour isoler la flore fongique.

Les résultats présentés dans le tableau 30, montrent des différences entre les charges des moisissures isolées à partir des trois échantillons :

- Dans le cas du milieu ISP2 additionné de 5% d'NaCl, la charge des moisissures isolée à partir de l'échantillon EA2 est plus 77 fois supérieure à celle isolée de l'échantillon EA3.
- Dans le cas du milieu ISP2 additionné de 7,5% d'NaCl :
 - La charge des moisissures isolée à partir de l'échantillon EA3 est 8 fois supérieure à celle isolée de l'échantillon EA2 ;
 - La charge des moisissures isolée à partir de l'échantillon EA3 est 7 fois supérieure à celle isolée de l'échantillon EA1.
- Dans le cas du milieu ISP4 additionné de 5% d'NaCl :
 - La charge des moisissures isolée à partir de l'échantillon EA3 est 210 fois supérieure à celle isolée de l'échantillon EA1 ;
 - La charge des moisissures isolée à partir de l'échantillon EA2 est 150 fois supérieure à celle isolée de l'échantillon EA1.

Résultats et discussion

- Dans le cas du milieu ISP5 additionné de 5% d'NaCl :
 - La charge des moisissures isolée à partir de l'échantillon EA2 est 9 fois supérieure à celle isolée de l'échantillon EA1 ;
 - La charge des moisissures isolée à partir de l'échantillon EA3 est 2 fois supérieure à celle isolée de l'échantillon EA1.

- Dans le cas du milieu ISP5 additionné de 7,5% d'NaCl, la charge des moisissures isolée à partir de l'échantillon EA2 est 10 fois supérieure à celle isolée de l'échantillon EA1 et plus que 90fois supérieure à celle isolée de l'échantillon EA3.

L'ensemble de ses observations nous permettent de supposer la présence d'un effet de l'échantillon sur les résultats de dénombrement des moisissures.

De ce fait, nous allons procéder à une analyse statistique pour confirmer ou infirmer l'effet de l'échantillon sur les résultats de dénombrement des moisissures.

5.2. Analyse statistique sur effet de l'échantillon du sol

a. Test de normalité

Les hypothèses

H0 : les variables sont distribuées selon la loi normale.

H1 : les variables ne sont pas distribuées selon la loi normale.

La règle de décision

$P > 0,05$: H0 est non rejetée $P \leq 0,05$: H0 est rejetée

Deux tests de normalité, présentés dans le tableau 31, ont été réalisés sur les résultats de dénombrement des moisissures isolées à partir de trois échantillons EA1, EA2 et EA3. Il s'agit des tests de Kolmogorov-Smirnov et Shapiro-Wilk pour lesquels les seuils de signification respectifs sont de 0,200 et 0,05.

Tableau 31 : Tests de normalité Shapiro-Wilk et Kolmogorov-Smirnov de la distribution de résultats de dénombrement des moisissures isolées à partir des trois échantillons.

Échantillon	Kolmogorov-Smirnova			Shapiro-Wilk		
	Statistiques	ddl	Sig.	Statistiques	ddl	Sig.
EA1	,288	9	,030	,797	9	,019
EA2	,369	9	,001	,720	9	,002
EA3	,368	9	,001	,584	9	,000

Sig : valeur de signification ddl : degré de liberté

Résultats et discussion

Selon les résultats présentés dans le tableau 31, il apparaît que les valeurs de significations, obtenues pour la distribution des charges des moisissures isolées à partir des trois échantillons EA1, EA2, EA3, sont inférieures aux seuils de significations de Kolmogorov-Smirnov et Shapiro-Wilk. De ce fait, nous rejetons l'hypothèse H0 ; le test paramétrique ANOVA ne peut pas être appliqué pour étudier l'effet de l'échantillon sur la charge des moisissures isolée. Il sera remplacé par le test non paramétrique de Kruskal-Wallis.

b. Test de Kruskal Wallis

Les rangs moyens des valeurs de dénombrement de la flore fongique isolée à partir des échantillons EA1, EA2 et EA3 sont représentés dans le tableau 32. Ce test est appliqué sur les rangs moyens, calculés par ce même test, des valeurs de dénombrement des moisissures isolées à partir des trois échantillons.

Tableau 32 : Les rangs moyens des valeurs de dénombrement des moisissures isolées à partir des échantillons EA1, EA2 et EA3.

Échantillon	N	Rang moyen
EA1	9	13,94
EA2	9	15,61
EA3	9	12,44
Total	27	

Les hypothèses

H0 : les trois rangs moyens sont égaux ($r_{m1}=r_{m2}=r_{m3}$).

H1 : il existe au moins deux rangs moyens différents.

Les résultats du test Kruskal Wallis appliqués sur les rangs moyens des moisissures isolées à partir des échantillons sont représentés dans le tableau 33.

Tableau 33 : valeurs de significations asymptotiques bilatérales obtenues de l'application du test Kruskal Wallis sur la distribution de dénombrement des moisissures isolées à partir des échantillons EA1, EA2 et EA3.

	Champignons
Khi-deux	,718
ddl	2
Sig. Asymptotique	,698

D'après les résultats représentés dans le tableau 33, nous constatons que la valeur de signification asymptotique obtenue est supérieure au seuil de signification 0,05, ce qui nous permet d'accepter l'hypothèse H0 qui stipule que les rangs moyens sont égaux. Nous concluons qu'il n'y a pas des différences significatives entre les charges de la flore fongique

isolées depuis les trois échantillons EA1, EA2 et EA3. Donc, les échantillons utilisés n'ont pas un effet quantitativement significatif sur la flore fongique isolés.

5.3. Effet du milieu de culture sur les résultats de dénombrement de la flore fongique

Une comparaison grossière entre les milieux de culture et leur efficacité vis-à-vis de la charge fongique des trois échantillons de sol dévoilent que :

- À partir de l'échantillon EA1 et sur la concentration 5% d'NaCl :
 - La charge fongique isolée sur le milieu ISP2 est 500 fois supérieure à celle isolée sur le milieu ISP4 ;
 - La charge fongique isolée sur le milieu ISP5 est 20 fois supérieure à celle isolée sur le milieu ISP4.

- À partir de l'échantillon EA2 et sur la concentration 7,5% d'NaCl, la charge fongique isolée sur le milieu ISP5 est 20 fois supérieure à celle isolée sur le milieu ISP4.
- À partir de l'échantillon EA3 et sur la concentration 7,5% d'NaCl, la charge fongique isolée sur le milieu ISP2 est 183 fois supérieure à celle isolée sur le milieu ISP4.

L'ensemble de ses observations nous permettent de supposer la présence d'un effet du milieu de culture sur les résultats de dénombrement de la flore fongique.

5.4. Analyse statistique sur effet de milieu de culture

a. Test de normalité

Les hypothèses

H0 : les variables sont distribuées selon la loi normale.

H1 : les variables ne sont pas distribuées selon la loi normale.

La règle de décision

$P > 0,05$: H0 est non rejetée $P \leq 0,05$: H0 est rejetée

Deux tests de normalité, présentés dans le tableau 34, ont été réalisés sur les résultats de dénombrement des moisissures isolées à partir de trois milieux de culture ISP2, ISP4 et ISP5. Il s'agit des tests de Kolmogorov-Smirnov et Shapiro-Wilk pour lesquels les seuils de signification respectifs sont de 0,200 et 0,05.

Résultats et discussion

Tableau 34 : Tests de normalité Shapiro-Wilk et Kolmogorov-Smirnov de la distribution des charges des moisissures isolées sur les milieux ISP2, ISP4 et ISP5.

Milieu de culture	Kolmogorov-Smirnova			Shapiro-Wilk		
	Statistiques	ddl	Sig.	Statistiques	ddl	Sig.
ISP2	,264	9	,071	,880	9	,156
ISP4	,287	9	,031	,773	9	,010
ISP5	,370	9	,001	,561	9	,000

Sig : valeur de signification ddl : degré de liberté.

Selon les résultats présentés dans le tableau 34, il apparaît que les valeurs de significations, obtenues pour la distribution des charges des moisissures isolées à partir ses trois milieux de culture ISP4 et ISP5 sont inférieures aux seuils de significations de Kolmogorov-Smirnov et Shapiro-Wilk. De ce fait, nous rejeton l'hypothèse H0 ; le test paramétrique ANOVA ne peut pas être appliqué pour étudier l'effet de l'échantillon sur la charge des moisissures isolée. Il sera remplacé par le test non paramétrique de Kruskal-Wallis.

b. Test de Kruskal Wallis

Les rangs moyens des valeurs de dénombrement de flore fongique sur les trois milieux de culture sont représentés dans le tableau 35. Ce test est appliqué sur les rangs moyens, calculés par ce même test, des valeurs de dénombrement des moisissures sur les trois milieux de cultures.

Tableau 35 : Les rangs moyens des valeurs de dénombrement des moisissures isolées sur les trois milieux de culture ISP2, ISP4 et ISP5.

Milieu de culture	N	Rang moyen
ISP2	9	18,83
ISP4	9	10,67
ISP5	9	12,50
Total	27	

Les hypothèses

H0 : les trois rangs moyens sont égaux ($rm1=rm2=rm3$).

H1 : il existe au moins deux rangs moyens différents.

Les résultats de test Kruskal Wallis appliqués sur les rangs moyens des moisissures isolés sur les milieux de cultures ISP2, ISP4 et ISP5 sont représentés dans le tableau 36.

Tableau 36 : valeurs de significations asymptotiques bilatérales obtenues de l'application du test Kruskal Wallis sur la distribution des moisissures isolées sur les milieux de culture ISP2, ISP4 et ISP5.

	Champignons
Khi-deux	5,256
ddl	2
Sig. Asymptotique	,072

D'après les résultats représentés dans le tableau 36, nous constatons que la valeur de signification asymptotique obtenue est supérieure au seuil de signification 0,05, ce qui nous permet d'accepter l'hypothèse H_0 qui stipulée que les rangs moyens sont égaux. Nous concluons qu'il n'y a pas des différences significatives entre les charges des moisissures isolées depuis les trois milieux de cultures. Donc, les milieux de cultures ISP2, ISP4 et ISP5 utilisés n'ont pas un effet quantitativement significatif sur les moisissures isolées.

5.5. Effet de la concentration d'NaCl sur les résultats de dénombrement de la flore fongique

Les résultats présentés dans le tableau 30 montrent des différences entre les charges fongique isolés à partir des trois échantillons :

- À partir de l'échantillon EA2 et sur le milieu ISP2, la charge fongique isolée à 5% d'NaCl est 7 fois supérieure à celle isolée sur 10% d'NaCl.
- À partir de l'échantillon EA1 et sur le milieu ISP4 :
 - La charge fongique isolée à 10% d'NaCl est 420 fois supérieure à celle isolée sur 5% d'NaCl ;
 - La charge fongique isolée à 7,5% d'NaCl est 26 fois supérieure à celle isolée sur 5% d'NaCl.
- À partir de l'échantillon EA3 et sur le milieu ISP5, la charge fongique isolée à 5% d'NaCl est 13 fois supérieure à celle isolée sur 10% d'NaCl.

L'ensemble de ses observations nous permettent de supposer la présence d'un effet de la concentration d'NaCl sur les résultats de dénombrement de la flore fongique.

5.6. Analyse statistique sur effet de la concentration d'NaCl

a. Test de normalité

Les hypothèses

H_0 : les variables sont distribuées selon la loi normale.

H_1 : les variables ne sont pas distribuées selon la loi normale.

La règle de décision

$P > 0,05$: H_0 est non rejetée

$P \leq 0,05$: H_0 est rejetée

Résultats et discussion

Deux tests de normalité, présentés dans le tableau 37, ont été réalisés sur les résultats de dénombrement des moisissures isolés sur les trois concentrations d'NaCl, 5%, 7,5% et 10%.

Il s'agit des tests de Kolmogorov-Smirnov et Shapiro-Wilk pour lesquels les seuils de signification respectifs sont de 0,200 et 0,05.

Tableau 37 : Tests de normalité Shapiro-Wilk et Kolmogorov-Smirnov de la distribution de résultats les charges des moisissures isolées à 5%, 7,5% et 10% d'NaCl.

NaCl	Kolmogorov-Smirnova			Shapiro-Wilk		
	Statistiques	ddl	Sig.	Statistiques	ddl	Sig.
5%	,280	9	,041	,829	9	,043
7,5%	,407	9	,000	,647	9	,000
10%	,302	9	,017	,736	9	,004

Sig : valeur de signification ddl : degré de liberté.

Selon les résultats présentés dans le tableau 37, il apparaît que les valeurs de significations, obtenues pour la distribution des charges des moisissures isolées sur les trois concentrations d'NaCl, sont inférieures aux seuils de significations de Kolmogorov-Smirnov et Shapiro-Wilk. De ce fait, nous rejeton l'hypothèse H₀ ; le test paramétrique ANOVA ne peut pas être appliqué pour étudier l'effet d'NaCl sur la charge des moisissures isolées. Il sera remplacé par le test non paramétrique de Kruskal-Wallis.

b. Test de Kruskal Wallis

Les rangs moyens des valeurs de dénombrement de flore fongique sur les trois concentrations d'NaCl 5%, 7,5% et 10% sont représentés dans le tableau 38. Ce test est appliqué sur les rangs moyens, calculés par ce même test, des valeurs de dénombrement des moisissures sur les concentrations d'NaCl.

Tableau 38 : Les rangs moyens des valeurs de résultats de dénombrement des moisissures isolées à 5%, 7,5% et 10% d'NaCl.

NaCl	N	Rang moyen :
5%	9	14,78
7,5%	9	14,00
10%	9	13,22
Total	27	

Les hypothèses

H₀ : les trois rangs moyens sont égaux ($\mu_1 = \mu_2 = \mu_3$).

H₁ : il existe au moins deux rangs moyens différents.

Les résultats de test Kruskal Wallis appliqués sur les rangs moyens des moisissures isolés depuis les trois concentrations d'NaCl sont représentés dans le tableau 39.

Résultats et discussion

Tableau 39 : Les rangs moyens des valeurs de résultats de dénombrement des moisissures isolées à 5%, 7,5% et 10% d'NaCl.

	Champignons
Khi-deux	,173
ddl	2
Sig. Asymptotique	,917

D'après les résultats représentés dans le tableau 39, nous constatons que la valeur de signification asymptotique obtenue est supérieure au seuil de signification 0,05, ce qui nous permet d'accepter l'hypothèse H0 qui stipulée que les rangs moyens sont égaux. Nous concluons qu'il n'y a pas des différences significatives entre les charges des moisissures isolées depuis les trois concentrations d'NaCl, 5%, 7,5% et 10%. Donc, les concentrations d'NaCl utilisées n'ont pas un effet quantitativement significatif sur la flore fongique isolée.

6. Purification et conservation

Suit aux protocoles d'isolement adoptés, nous avons pu purifier et conserver 36 isolats. Les codes donnés à ces isolats ainsi que leurs origines et les milieux de l'isolement sont présentés dans le tableau 40.

Tableau 40 : Le code des souches actinomycètes isolées à partir des trois échantillons sur les milieux ISP2, ISP4 et ISP5 additionnés de 5%, 7,5% et 10% d'NaCl.

Échantillon	ISP2			ISP4			ISP5		
	5%	7,5%	10%	5%	7,5%	10%	5%	7,5%	10%
EA1	/	/	/	S3, S28, S31	S45 S58 S48	S69	S87	S85 S168 S169 S171 S172 S76	S95 S173 S174 S99 S185
EA2	/	S159	/	S109, S110 S120, S122 S123, S124 S132, S134 S106, S107	S140 S141	/	/	/	/
EA3	/	/	/	S178		S191	S188	S187	/

7. Test halophile et halotolérants des isolats actinomycètes

Les résultats obtenus du test d'halophilie et d'halotolérants des souches d'actinomycètes étudiées sont représentées dans le tableau 41.

Résultats et discussion

Tableau 41 : Résultats du test d'halophilie et d'halotolérance des isolats d'actinomycètes.

Souches	Milieu de culture		
	ISP2 [0% NaCl]	ISP4 [0% NaCl]	ISP5 [0% NaCl]
S03	+	+	+
S28	+	+	+
S31	-	-	-
S45	+	+	+
S58	+	+	+
S69	+	+	+
S76	+	+	+
S85	+	+	+
S87	+	+	+
S95	+	+	+
S99	+	+	+
S106	+	+	+
S107	+	+	+
S109	+	+	+
S110	+	+	+
S120	-	-	-
S122	+	+	+
S123	+	+	+
S124	+	+	+
S132	+	+	+
S134	-	-	-
S140	+	+	+
S141	+	+	+
S159	-	-	-
S168	+	+	+
S169	+	+	+
S171	+	+	+
S172	+	+	+
S173	+	+	+
S174	+	+	+
S178	+	+	+
S187	+	+	+
S188	+	+	+
S191	+	+	+
S48	+	+	+
S185	+	+	+

Résultats et discussion

Les résultats de ce test ont révélé que, à l'exception des isolats S31, S120, S134 et S159, tous les autres isolats manifestent une croissance en absence d'NaCl sur les trois milieux d'isolement ISP2, ISP4 et ISP5 (figure 13). Donc, nous avons conclu que seuls les isolats S31, S134, S120 et S159 sont halophiles tandis que tous les autres isolats sont halotolérants.

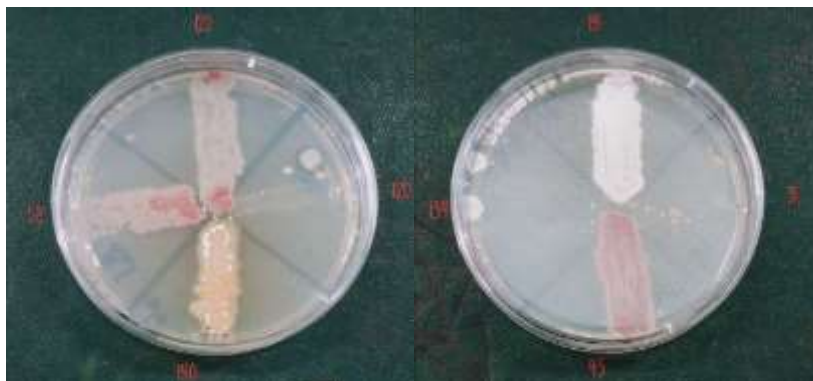


Figure 13 : photographie représentent le résultat du test d'halophile et d'halotolérance de certains isolats d'actinomycètes.

8. L'aptitude à la croissance

Les résultats de l'aptitude à la croissance de 36 souches actinomycètes sur les milieux de cultures ISP2, ISP4 et ISP5 additionnés de 5%, 7,5% et 10% d'NaCl sont présentés dans le tableau 42.

Tableau 42 : L'aptitude à la croissance des isolats sur les milieux ISP2, ISP4 et ISP5 additionnés de 5%, 7,5% et 10% d'NaCl.

Souches	ISP2			ISP4			ISP5		
	5%	7,5%	10%	5%	7,5%	10%	5%	7,5%	10%
S 3	++	+++	++	+++	+++	++	+++	+	++
S 28	+	++	++	++	++	+	+++	++	+
S 31	+	-	-	++	++	-	-	+	+
S 45	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++	+
S 48	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++	-
S 58	++	+	++	++	++	+++	+++	+++	+++
S 69	+++	++	++	++	++	++	+++	++	+++
S 76	+++	+++	+	+++	+	++	+	+	++
S 85	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++
S 87	+++	+++	+++	+++	+++	+	+++	++	+
S 95	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++
S 99	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++
S 106	+++	++	++	+++	+++	++	+++	++	-
S 107	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++
S 109	+	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++

+++ : Bonne croissance. ++ : Croissance modérée. + : Croissance faible. - : Absence de croissance.

Résultats et discussion

Tableau 42 : L'aptitude à la croissance des isolats sur les milieux ISP2, ISP4 et ISP5 additionnés de 5%, 7,5% et 10% d'NaCl (Suite).

Souches	ISP2			ISP4			ISP5		
	5%	7,5%	10%	5%	7,5%	10%	5%	7,5%	10%
S 110	+++	+++	++	++	+	+	+++	++	+
S 120	+++	++	++	+++	+++	++	-	+	-
S 122	++	-	+++	+++	+++	+++	+	+++	+++
S 123	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
S 124	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
S 132	+++	+	-	+++	+	-	+++	+	-
S 134	+++	+	+	+	+	+	-	+	+
S 140	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
S 141	+++	+++	+++	+++	+	++	+++	+++	++
S 159	++	++	++	++	+	+	++	+	+
S 168	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++	++
S 169	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
S 171	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
S 172	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
S 173	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
S 174	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
S 178	+++	+++	+	+++	++	-	+++	+	-
S 185	+++	+++	++	++	++	+	+++	+	+
S 187	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
S 188	++	++	-	+	+	+	+++	+	+
S 191	+++	+++	++	+++	++	++	+++	+++	+

+++ : Bonne croissance. ++ : Croissance modérée. + : Croissance faible. - : Absence de croissance.

8.1. L'aptitude à la croissance sur les trois milieux de culture

D'après les résultats présentés dans le tableau 42, nous remarquons que tous les isolats d'actinomycètes peuvent croître sur les trois milieux de culture ISP2, ISP4 et ISP5.

La figure 14 représente un histogramme empilé montrant les pourcentages des isolats d'actinomycètes qui peuvent croître sur les milieux de culture ISP2, ISP4 et ISP5, ainsi que la qualité de cette croissance (bonne croissance, croissance modérée, croissance faible).

Résultats et discussion

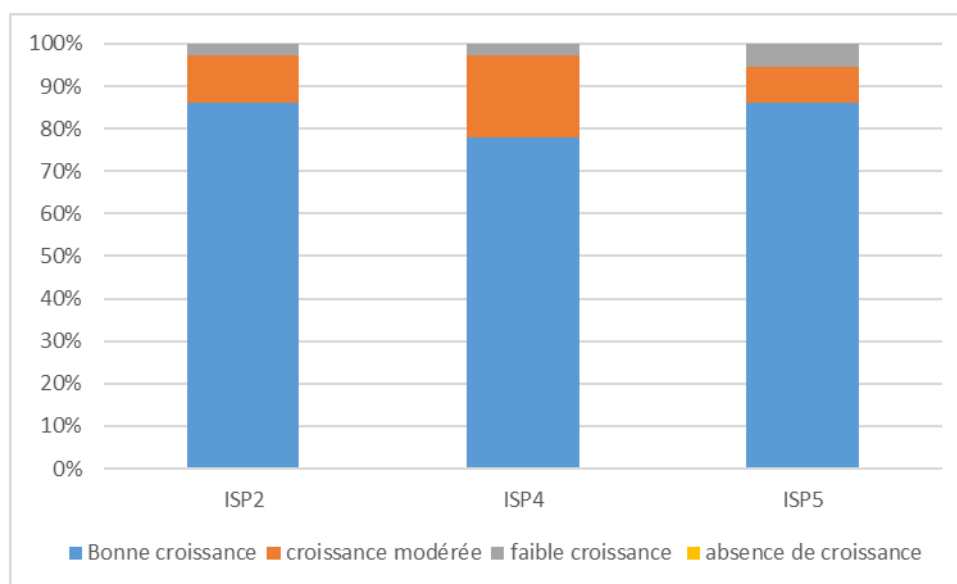


Figure 14 : Histogramme représentant la croissance des isolats d'actinomycètes isolée sur les trois milieux de culture.

D'après la figure 14, nous remarquons que 85% des souches étudiées ont une bonne croissance sur le milieu de culture ISP2 et ISP5, alors que 78% des souches d'actinomycètes ont une bonne croissance sur le milieu de culture ISP4.

En se basant sur les observations précédentes, nous pouvons expliquer le pourcentage élevé dans le milieu ISP2 en se référant à l'abondance du milieu en éléments nutritifs essentiels et facilement dégradables. En effet, les ingrédients présents dans le milieu ISP2 fournissent des sources d'énergie, de carbone (glucose) et d'azote nécessaires à la croissance des actinomycètes. De plus, les vitamines et les cofacteurs présents dans l'extrait de levure et l'extrait de malte aident à soutenir les processus métaboliques des actinomycètes. Le milieu de culture ISP5 favorise une bonne croissance des isolats d'actinomycètes. Cela est dû au fait qu'il contient une source d'énergie et de carbone facilement utilisable (glycérol) et que cette source d'azote est organique (L-asparagine). Ceci n'est pas le cas du milieu ISP4 dont la source d'énergie et de carbone est difficilement dégradable (amidon) et dont la source d'azote est minérale (sulfate d'ammonium).

8.2. L'aptitude à la croissance sur les différentes concentrations d'NaCl

D'après les résultats présentés dans le tableau 42, nous remarquons que 97,22% des isolats d'actinomycètes (35 souches) peuvent croître sur les trois concentrations d'NaCl 5%, 7,5% et 10%. Seule la souche S132 est incapable de croître sur la concentration 10% d'NaCl.

La figure 15 représente un histogramme empilé montrant les pourcentages des isolats d'actinomycètes qui peuvent croître sur les concentrations 5%, 7,5% et 10% d'NaCl, ainsi que la qualité de cette croissance (bonne croissance, croissance modérée, croissance faible, absence de croissance).

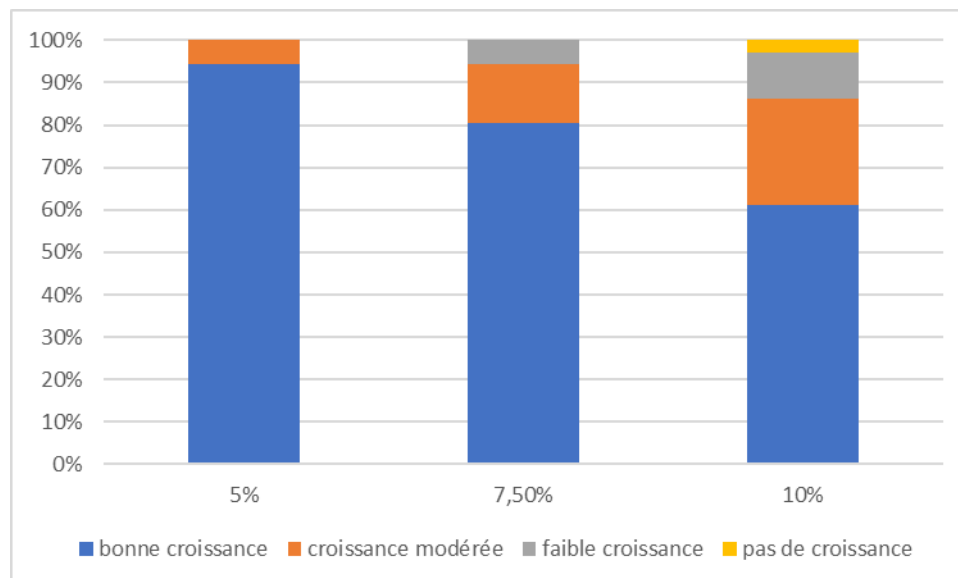


Figure 15 : Histogramme représentant la croissance des isolats d'actinomycètes isolée sur les concentrations 5%, 7,5% et 10% d'NaCl.

Nous remarquons, d'après la figure 15, que 95% des souches d'actinomycètes étudiées (34 souches) ont une bonne croissance sur la concentration 5% d'NaCl, et que 80% des souches (29 souches) ont une bonne croissance sur la concentration 7,5% d'NaCl. Cependant, 61% des souches étudiées, seulement, ont une bonne croissance sur la concentration 10% d'NaCl.

Avec ces constats, il devient évident que la qualité de la croissance des isolats diminue avec l'augmentation de la concentration d'NaCl. En effet, des niveaux élevés d'NaCl peuvent inhiber la croissance des actinomycètes en perturbant l'homéostasie cellulaire. Les microorganismes halophiles et halotolérants utilisent une diversité de mécanismes pour résister à la pression osmotique causée par une salinité élevée. Étant donné que toutes les membranes biologiques sont perméables à l'eau, tous les microorganismes doivent maintenir leur cytoplasme en iso-osmose avec leur environnement. Dans tous les cas, les ions Na^+ sont exclus autant que possible du cytoplasme (Oren, 2002).

9. L'aptitude à la sporulation

Les résultats de l'aptitude à la sporulation de 36 souches actinomycètes sur les milieux de cultures ISP2, ISP4 et ISP5 additionnés de 5%, 7,5% et 10% d'NaCl sont présentés dans le tableau 43.

Résultats et discussion

Tableau 43 : L'aptitude à la sporulation des isolats sur les milieux ISP2, ISP4, ISP5 additionnés de 5%, 7,5% et 10% d'NaCl.

Souches	ISP2			ISP4			ISP5		
	5%	7,5%	10%	5%	5%	7,5%	10%	7,5%	5%
S 3	++	+++	++	+++	+++	+	+++	+	++
S 28	+	++	++	++	++	+	++	-	-
S 31	-	/	/	++	++	/	/	+	-
S 45	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++	+
S 48	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++	/
S 58	-	+	-	+	+	+	+	+	+
S 69	+++	+	+++	++	++	++	+	+++	+
S 76	+++	+++	-	+++	-	-	-	-	-
S 85	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++	++
S 87	++	-	+	++	+	+	++	+	-
S 95	+++	+++	+++	++	++	+++	+++	+++	++
S 99	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++
S 106	+++	-	-	+++	+	+	+++	-	/
S 107	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++
S 109	-	++	+++	++	++	++	+++	+++	++
S 110	+++	+++	+	++	-	-	-	-	-
S 120	-	-	-	++	++	-	/	-	/
S 122	+	/	-	++	++	+	-	++	++
S 123	+++	+++	++	+++	+++	+++	+++	++	+++
S 124	+++	+++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
S 132	+++	-	/	+++	/	/	-	-	/
S 134	-	-	-	-	-	-	/	-	-
S 140	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++	+++
S 141	+++	+++	+++	+++	-	-	+++	+++	++
S 159	++	+	++	+	-	+	+	+	+
S 168	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++	+
S 169	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++	+++
S 171	+++	+++	+	-	-	++	+	++	+++
S 172	+++	+++	+++	-	++	-	+++	+++	+++
S 173	+++	+++	+++	++	++	++	+++	+++	+++
S 174	+++	+++	+++	+	+	+	+++	++	+++
S 178	+++	++	-	+++	-	/	+++	-	/
S 185	+++	+	++	++	+	+	-	+	-
S 187	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
S 188	+	-	/	-	-	-	-	-	-
S 191	+++	+++	-	+++	+	+	+++	+++	-

+++ : Bonne sporulation. ++ : Sporulation modérée. + : Sporulation faible. / : Absence de croissance.

- : Absence de sporulation.

9.1. L'aptitude à la sporulation sur les trois milieux de culture

D'après les résultats présentés dans le tableau 43, nous remarquons que le milieu de culture ISP4, et à moindre degré ISP2, favorisent la sporulation du plus grand nombre d'isolats actinomycètes ; avec des pourcentages, respective, de 94,44% et 91,66%. Le milieu de culture ISP5 est favorable à la sporulation de 83,33% des isolats seulement.

Nous constatons également que 35 isolats d'actinomycètes peuvent sporuler sur les trois milieux de culture ISP2, ISP4 et ISP5, ce qui représente 97,22% de l'ensemble des souches étudiées. Seule la souche S134 est incapable de sporuler sur aucun des trois milieux de cultures.

La figure 16 représente la sporulation et la couleur de la masse sporale de certains isolats actinomycètes.

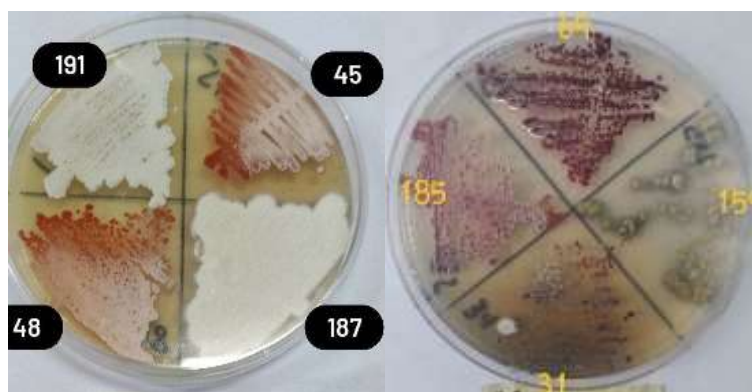


Figure 16 : Photographie de la sporulation de certains isolats actinomycètes.

La figure17 représente un histogramme empilé des pourcentages des isolats d'actinomycètes qui peuvent sporuler sur les milieux de culture ISP2, ISP4 et, ISP5, ainsi que la qualité de cette sporulation (bonne sporulation, sporulation modérée, sporulation faible, absence de sporulation).

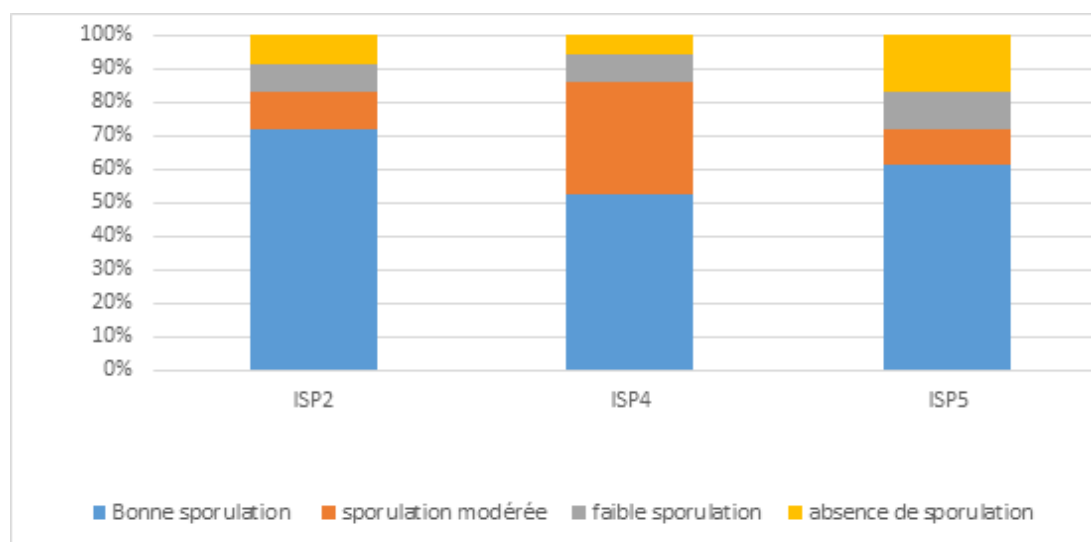


Figure 17 : Histogramme représentant l'aptitude à la sporulation des isolats d'actinomycètes isolée sur les trois milieux de culture.

D'après la figure 17, nous remarquons que 71% des souches étudiées ont une bonne sporulation sur le milieu de culture ISP2, et 60% d'elles ont une bonne sporulation sur le milieu de culture ISP5. Alors que 52% des souches d'actinomycètes étudiées ont une bonne sporulation sur le milieu de culture ISP4. Les ingrédients du milieu de culture peuvent être l'explication à cette différence.

Certaines études ont révélé que des milieux de culture contenant de l'extrait de levure et du glucose (ingrédient du milieu ISP2) sont plus favorables à la sporulation que d'autres milieux ; c'est l'exemple d'une étude faite par Kontro *et al.* (2007) sur 26 milieux de culture et leurs effets sur la sporulation de dix espèces de *Streptomyces*. De même, la littérature mentionne que certains acides aminés peuvent inhiber la sporulation, alors que d'autres sont d'excellents stimulateur de la sporulation comme est le cas de l'asparagine ; source d'azote dans le milieu ISP5 (Djaballah, 2021).

9.2. L'aptitude à la sporulation sur les trois différentes concentrations d'NaCl

D'après les résultats présentés dans le tableau 43, nous remarquons que 69,44% des isolats d'actinomycètes (25 souches) peuvent sporuler sur les trois concentrations d'NaCl. 11,11% des souches d'actinomycètes à étudiée sont capable de sporuler sur les concentrations 5% et 7,5% d'NaCl seulement ; il s'agit des isolats S31, S76, S120 et S178. Les souches S132 et S188 sont apte à sporuler sur 5% d'NaCl seulement.

Résultats et discussion

La figure 18 représente un histogramme empilé des pourcentages des isolats d'actinomycètes qui peuvent sporuler sur les concentrations 5%, 7,5% et 10% d'NaCl, ainsi que la qualité de cette sporulation (bonne sporulation, sporulation modérée, sporulation faible, absence de sporulation).

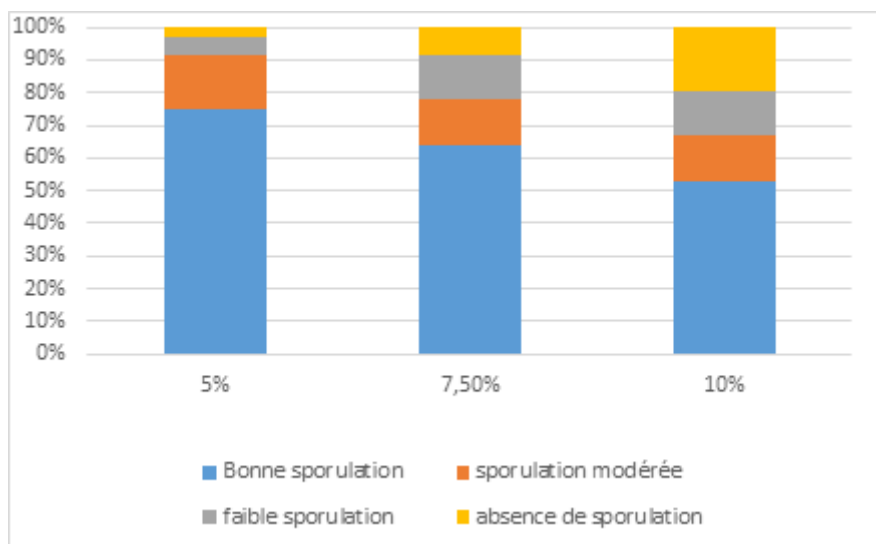


Figure 18 : Histogramme représentant l'aptitude à la sporulation des isolats d'actinomycètes sur les trois concentrations d'NaCl.

D'après la figure 18 nous remarquons que 72,22% des souches étudiées ont une bonne sporulation sur la concentration 5% d'NaCl, et que 61,11% d'elles ont une bonne sporulation sur la concentration 7,5% d'NaCl. Alors que 52,77% des souches d'actinomycètes étudiées ont une bonne sporulation sur la concentration 10% d'NaCl.

La figure révèle clairement que l'augmentation de la concentration d'NaCl entraîne, non seulement, une réduction du pourcentage des souches sporulantes, mais également, une réduction de la qualité de la sporulation.

10. L'aptitude à la production des pigments

Le tableau 44 représente les résultats de l'aptitude à la production des pigments par les isolats actinomycètes sur les milieux ISP2, ISP4, ISP5 additionnés de 5%, 7,5 %, 10 % d'NaCl.

Résultats et discussion

Tableau 44 : L'aptitude à la production des pigments par les isolats sur les milieux ISP2, ISP4, ISP5 additionnés de 5%, 7,5 %, 10 % d'NaCl.

Souches	ISP2			ISP4			ISP5		
	5%	7,5%	10%	5%	7,5%	10%	5%	7,5%	10%
S 3	-	Jaune non diffusible	-	-	-	-	-	-	-
S 28	Marron diffusible	-	-	-	-	-	-	-	-
S 31	-	/	/	Noir non diffusible	Noir non diffusible	/	/	-	-
S 45	Rouge non diffusible	Rouge non diffusible	Rouge non diffusible	-	-	Rouge non diffusible	Rouge non diffusible	Rouge non diffusible	-
S 48	Rouge non diffusible	Rouge non diffusible	Rouge non diffusible	-	-	Rouge non diffusible	-	-	/
S 58	-	-	-	Rouge non diffusible	-	-	-	-	-
S 69	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S 76	Marron non diffusible	Jaune non diffusible	-	-	-	-	-	-	-
S 85	Marron non diffusible	Marron non diffusible	Marron non diffusible	-	-	-	Beige non diffusible	Beige non diffusible	-
S 87	-	-	-	-	-	-	-	Rouge non diffusible	-
S 95	Rouge non diffusible	Rouge non diffusible	Rouge non diffusible	Rouge claire diffusible	Rouge Diffusible	-	Beige non diffusible	Beige non diffusible	Beige non diffusible

- : Pas de production de pigment. / : Pas de croissance. N.D : Non déterminé

Résultats et discussion

Tableau 44 : L'aptitude à la production des pigments par les isolats sur les milieux ISP2, ISP4, ISP5 additionnés de 5%, 7,5 %, 10 % d'NaCl. (Suite).

Souches	ISP2			ISP4			ISP5		
	5%	7,5%	10%	5%	7,5%	10%	5%	7,5%	10%
S 99	Jaune non diffusible	Jaune non diffusible	Jaune non diffusible	-	-	-	-	Jaune non diffusible	-
S 106	-	-	-	-	-	-	Jaune non diffusible	N.D	/
S 107	Marron non diffusible	-	-	-	-	Noir diffusible	Jaune non diffusible	Noir diffusible	-
S 109	-	Beige non diffusible	Beige non diffusible	Beige non diffusible	Beige non diffusible	-	Marron diffusible	Marron diffusible	-
S 110	Marron diffusible	Marron diffusible	Jaune non diffusible	-	-	Marron non diffusible	Noir diffusible	-	-
S 120	-	Jaune non diffusible	-	-	-	-	/	-	/
S 122	-	/	-	Rouge diffusible	-	-	N.D	-	-
S 123	Beige non diffusible	Marron non diffusible	Beige non diffusible	-	-	Marron diffusible	Marron diffusible	Marron diffusible	Beige non diffusible
S 124	Beige non diffusible	Marron non diffusible	Beige non diffusible	-	-	Marron diffusible	Marron diffusible	Beige non diffusible	-
S 132	Rouge diffusible	-	/	-	/	/	Beige non diffusible	-	/
S 134	-	-	-	-	-	-	/	-	-
S 140	Marron diffusible	Marron diffusible	Jaune diffusible	-	-	-	Noir diffusible	Noir diffusible	Noir diffusible
S 141	-	Jaune non diffusible	-	-	-	Noir non diffusible	Noir diffusible	Noir diffusible	Noir diffusible

- : Pas de production de pigment. / : Pas de croissance. N.D : Non déterminé

Résultats et discussion

Tableau 44 : L'aptitude à la production des pigments par les isolats sur les milieux ISP2, ISP4, ISP5 additionnés de 5%, 7,5 %, 10 % d'NaCl. (Suite).

Souches	ISP2			ISP4			ISP5		
	5%	7,5%	10%	5%	7,5%	10%	5%	7,5%	10%
S 159	Jaune non diffusible	Jaune non diffusible	Jaune non diffusible	-	-	-	-	-	-
S 168	Marron non diffusible	Marron non diffusible	Marron non diffusible	-	-	Marron diffusible	Marron diffusible	Marron diffusible	-
S 169	Marron non diffusible	Marron non diffusible	Marron non diffusible	-	-	-	Marron diffusible	Marron diffusible	-
S 171	-	-	-	-	-	Marron diffusible	Marron non diffusible	Marron non diffusible	Marron diffusible
S 172	-	-	-	-	-	Jaune non diffusible	Noir diffusible	Noir non diffusible	Marron non diffusible
S 173	-	Jaune non diffusible	Jaune non diffusible	-	-	Marron non diffusible	-	Noir non diffusible	Marron diffusible
S 174	Jaune non diffusible	Jaune non diffusible	Jaune non diffusible	-	-	-	Marron non diffusible	-	-
S 178	Marron diffusible	Marron diffusible	Marron diffusible	-	-	/	Beige non diffusible	Beige non diffusible	/
S 185	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S 187	Noir diffusible	Noir non diffusible	Noir non diffusible	-	-	Jaune non diffusible	Noir non diffusible	Noir non diffusible	-
S 188	Marron non diffusible	Marron non diffusible	/	-	-	-	Marron diffusible	Marron diffusible	-
S 191	Jaune non diffusible	Jaune non diffusible	-	-	-	-	Jaune non diffusible	-	-
S 141	-	Jaune non diffusible	-	-	-	Noir non diffusible	Noir diffusible	Noir diffusible	Noir diffusible

- : Pas de production de pigment. / : Pas de croissance. N.D : Non déterminé

10.1. L'aptitude à la production de pigment sur les trois milieux de culture

D'après les résultats présentés dans le tableau 44, nous remarquons que 11 isolats d'actinomycètes peuvent produire des pigments de différentes couleurs sur les trois milieux de culture ; ce qui représente 30,55% de l'ensemble des souches étudiées. Les souches S69, S134 et S185 ne produisent aucun pigment sur aucun des trois milieux de cultures. 33,33% peuvent produire des pigments sur deux milieux de cultures, et 27,77% des souches étudiées peuvent produire des pigments sur un seul milieu de culture.

Les pigments produits sont d'une couleur jaune (15 souches), marron (17 souches), noir (8 souches), beige (7 souches) et rouge (8 souches) (figure19). Il s'agit de pigments diffusibles ou non diffusibles.

Les actinobactéries sont capables de produire des pigments sombres tels que la mélanine ou des Mélanoïses, qui sont considérés comme des éléments importants dans les études taxonomiques. Ces pigments, qui ont généralement une couleur noire ou brune foncée, sont formés par les actinobactéries par polymérisation oxydative de composés phénoliques et indoliques. La structure moléculaire de ces pigments peut varier, et ils peuvent être de différentes couleurs, notamment rouge, rose, jaune, orange, brunâtre, brun verdâtre, brun foncé, noir, violet ou bleu, en fonction du milieu de culture utilisé, de la souche bactérienne et de l'âge de la culture. Ces pigments peuvent être présents soit sous forme dissoute dans le milieu de culture, soit retenus dans le mycélium (Hazarika et Thakur, 2020).

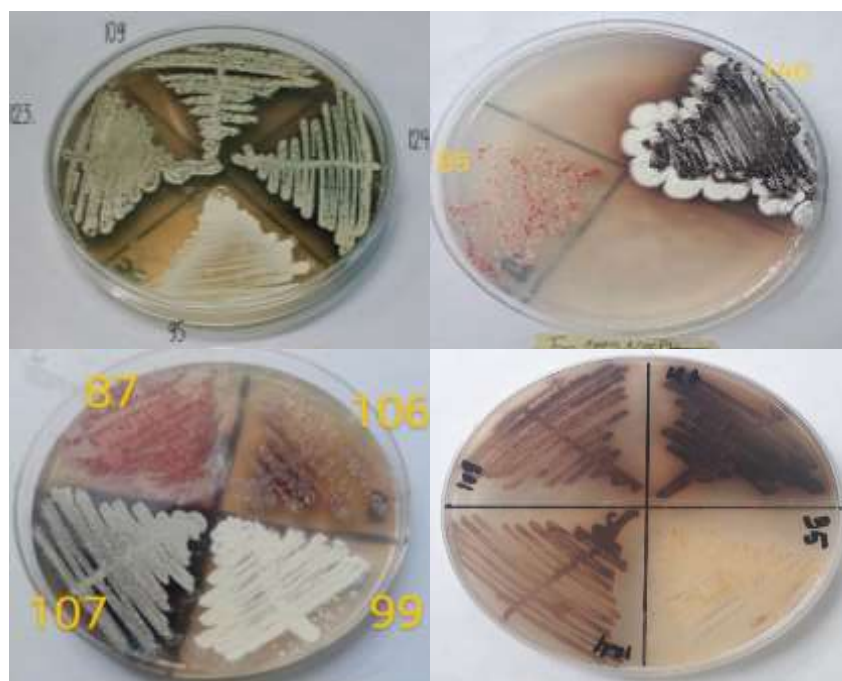


Figure 19 : Photographies de la production de pigments par certaines souches actinomycètes.

Résultats et discussion

La figure 20 représente un histogramme empilé des pourcentages des isolats d'actinomycètes qui peuvent produire des pigments sur les milieux de culture ISP2, ISP4 et ISP5 (présence ou absence de pigment).

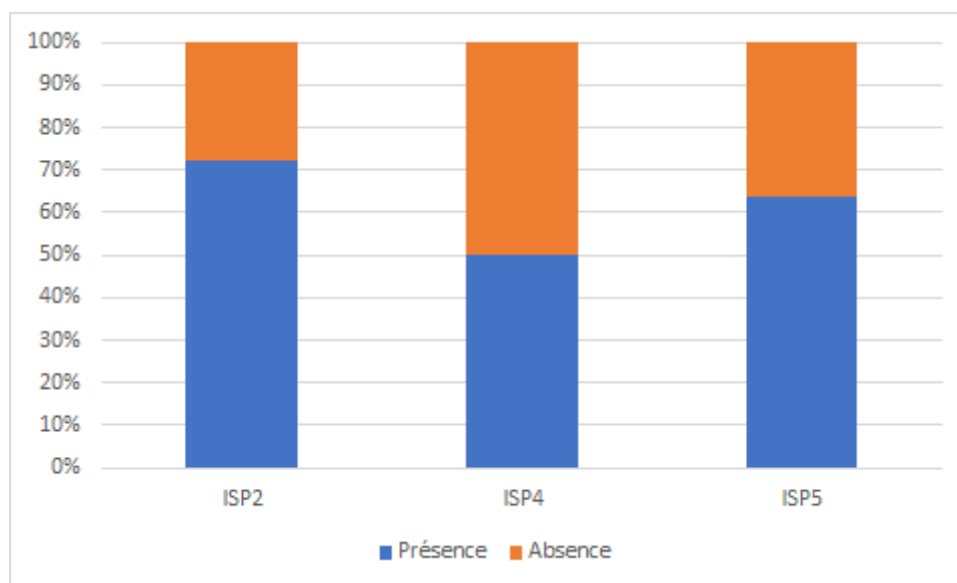


Figure 20 : Histogramme représentant la production de pigment par des isolats d'actinomycètes sur les trois milieux de culture.

D'après la figure 20, nous remarquons que le milieu de culture ISP2 est favorable à une production de pigments chez 72,22% des souches étudiées, contre le milieu de culture ISP5 qui favorise la production chez 66,66% des souches et le milieu de culture ISP4 favorable à la production de pigments pour 50% des souches d'actinomycètes étudiées seulement.

10.2. L'aptitude à la pigmentation sur les trois différentes concentrations d'NaCl

D'après les résultats présentés dans le tableau 44, nous remarquons que 55,55% des isolats d'actinomycètes (20 souches) peuvent produire des pigments sur les trois concentrations d'NaCl 5%, 7,5% et 10%. 11,11% des souches d'actinomycètes sont capables de produire des pigments sur les concentrations 5% et 7,5% d'NaCl seulement ; il s'agit des souches S76, S191, S188 et S31. Six souches sont aptes à produire des pigments sur la seule concentration 5% d'NaCl ; il s'agit de S132, S28, S58, S3, S120 et S122.

La figure 21 représente un histogramme empilé montrant des pourcentages des isolats d'actinomycètes qui peuvent produire des pigments sur les trois concentrations d'NaCl 5%, 7,5% et 10%.

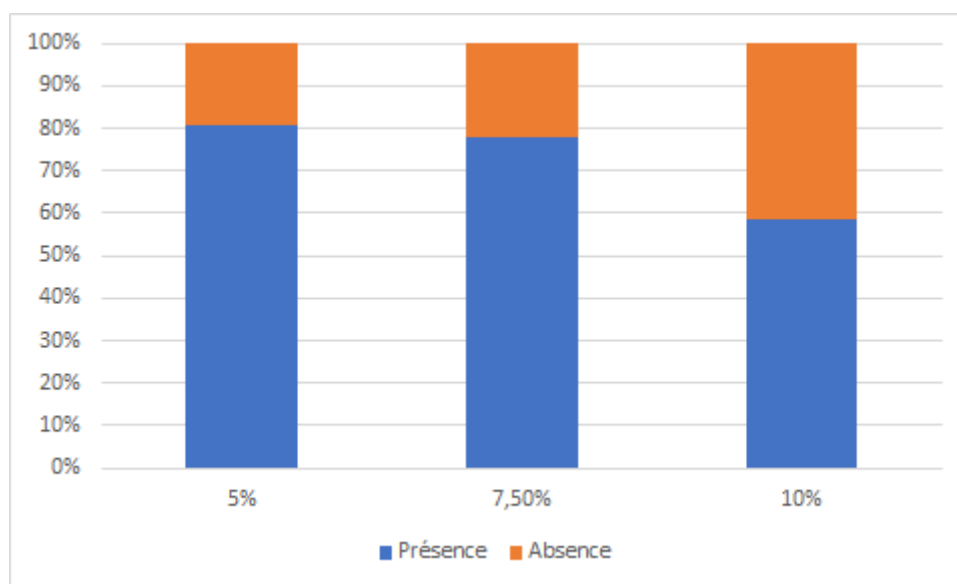


Figure 21 : Histogramme représentant la production de pigment par des isolats d'actinomycètes isolée sur les trois concentrations d'NaCl.

D'après la figure 21, nous remarquons que 80,55% des souches produisent des pigments sur la concentration 5%. Ce pourcentage diminue à 77,77% représentant les souches produisant des pigments sur la concentration 7,5%. Cette diminution se poursuit pour atteindre la valeur de 58,33% des souches d'actinomycètes sur la concentration 10%.

Donc, l'augmentation de la concentration d'NaCl s'accompagne d'une réduction du pourcentage des souches actinomycètes productrices de pigments. Autrement dit, les concentrations élevées de chlorure de sodium (NaCl) peuvent inhiber la croissance et la production de pigments chez certains actinomycètes. Cela est dû à l'effet de la pression osmotique élevée induite par le NaCl, ce qui entraîne un stress cellulaire et peut inhiber la production de pigments. En revanche, des concentrations modérées d'NaCl peuvent stimuler la production de pigments. Donc, pour résumer, l'effet d'NaCl sur la pigmentation des actinomycètes dépendent du niveau de concentration : les concentrations modérées peuvent stimuler la pigmentation, tandis que les concentrations élevées peuvent l'inhiber.

11. La mise en évidence d'activités enzymatiques chez les actinomycètes

11.1. Hydrolyse de la L-asparagine

Les résultats de l'aptitude de 36 souches à hydrolyser la L-asparagine sont représentés dans le tableau 45.

Tableau 45 : Résultats de l'aptitude de 36 souches à la production de la L-asparaginase.

Souches	L-asparaginase	Souches	L-asparaginase
S3	+	S123	+
S28	-	S124	+
S31	-	S132	+
S45	-	S134	+
S48	+	S140	+
S58	-	S141	+
S69	-	S159	-
S76	+	S168	+
S85	-	S169	+
S87	-	S171	+
S95	-	S172	+
S99	+	S173	+
S106	+	S174	+
S107	+	S178	+
S109	+	S185	+
S110	+	S187	-
S120	-	S188	+
S122	-	S191	-

+ : Présence - : Absence.

À partir des résultats présentés dans le tableau 45, nous constatons que 63,88% des souches d'actinomycètes sont capables d'hydrolyser l'asparagine, cela montre qu'elles possèdent la L-asparaginase.

Résultats et discussion

La figure 22 représente les photographies du test d'hydrolyse de la L-asparagine par certaines souches actinomycètes avec une boîte du témoin négatif.

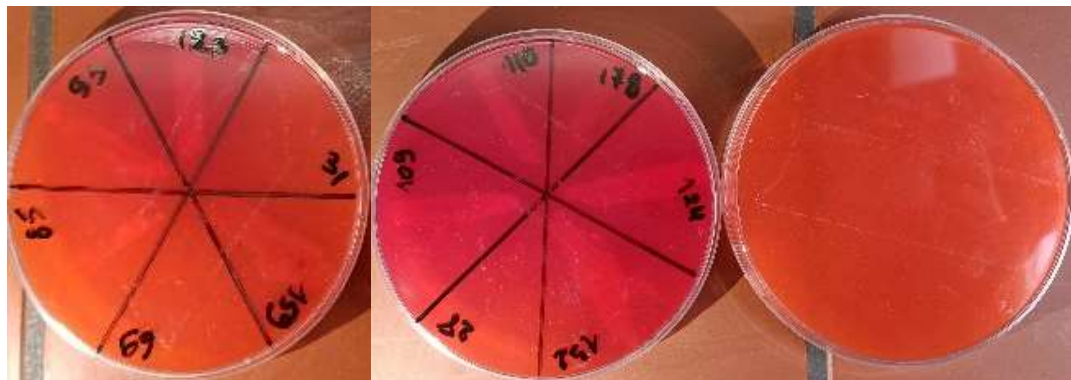


Figure 22 : Photographies du test d'hydrolyse de la L-asparagine par certaines souches actinomycètes avec une boîte du témoin négatif.

Le virage de la couleur du milieu M9 du rouge vers le rose autour de la croissance est dû à l'augmentation du pH du milieu à cause de la dégradation de la L-asparagine et la libération des ions d'ammoniac.

11.2. Hydrolyse d'amidon

Les résultats de l'aptitude à la production d'amylases chez 36 souches sur le milieu de cultures ISP4 additionnés de 5%, 7,5% et 10% d'NaCl sont présentés dans le tableau 46.

Tableau 46 : Production d'amylases chez 36 souches sur le milieu de cultures ISP4 additionnés de 5%, 7,5% et 10% d'NaCl.

Test d'amylase sur ISP4							
Souches	5% NaCl	7,5% NaCl	10% NaCl	Souches	5% NaCl	7,5% NaCl	10% NaCl
S3	+	+	+	S123	+	+	+
S28	+	+	-	S124	+	+	+
S31	-	-	-	S132	+	+	-
S45	-	-	-	S134	+	+	-
S48	+	-	-	S140	+	+	+
S58	+	+	+	S141	+	+	+
S69	-	-	-	S159	-	-	-
S76	+	+	-	S168	+	+	+
S85	+	+	+	S169	+	+	+
S87	+	+	+	S171	+	+	+
S95	+	+	+	S172	+	+	+

Résultats et discussion

S99	+	+	+	S173	+	+	+
S106	+	+	+	S174	+	+	+
S107	+	+	+	S178	+	+	-
S109	+	+	+	S185	+	-	-
S110	+	+	-	S187	-	-	-
S120	+	+	-	S188	+	+	-
S122	-	-	-	S191	+	+	+

D'après les résultats de tableau 46, nous remarquons que 83,3% des souches ont une activité amylolytique. Après addition du Lugol, la dégradation de l'amidon traduit par l'apparition d'un halo clair autour de la culture d'actinomycète, cela montre que ces souches possèdent une amylase (figure 23).

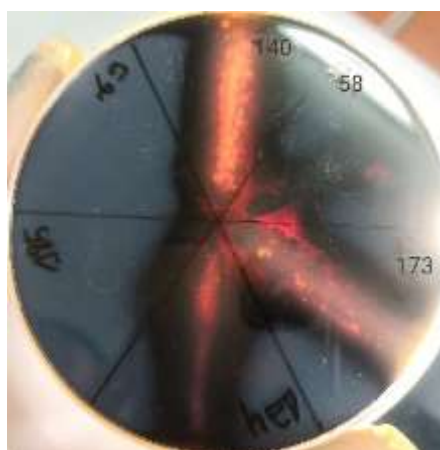


Figure 23 : Activité amylolytique de quelques souches actinomycètes.

Toutefois, nous avons constaté un fait surprenant où 13 souches sont capables de croître sur le milieu ISP4 sans produire des amylases ; sachant que la seule source de carbone et d'énergie disponible dans ce milieu est l'amidon. Il s'agit des souches S31, S45, S48, S69, S76, S110, S120, S122, S134, S159, S185, S187 et S188 (figure 24).



Figure 24 : Souches actinomycètes S31, S45, S48, S159 et S187 croissant sur le milieu ISP4 additionné de 7,5% d'NaCl sans développant une activité amylolytique.

Une question pertinente se pose alors : comment ces souches actinomycètes arrivent elles à croître sans avoir accès à l'amidon ?

Nous supposons que ces souches sont des chimiolithotrophes qui sont capables d'oxyder la matière minérale pour tirer leur énergie nécessaire à la croissance. Toutefois, il est connu que les sources d'énergie que chimiolithotrophes peuvent utiliser sont : H_2 , S, Fe, NO_2^- et NH_4^+ , et le CO. En se basant sur la composition du milieu ISP4, nous pouvons supposer que le $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ et le $(NH_4)_2SO_4$ peuvent servir de sources d'énergie pour les chimiolithotrophes sous formes de S et d' NH_4^+ , alors que le $CaCO_3$ peut jouer le rôle de source de carbone (HCO_3^-).

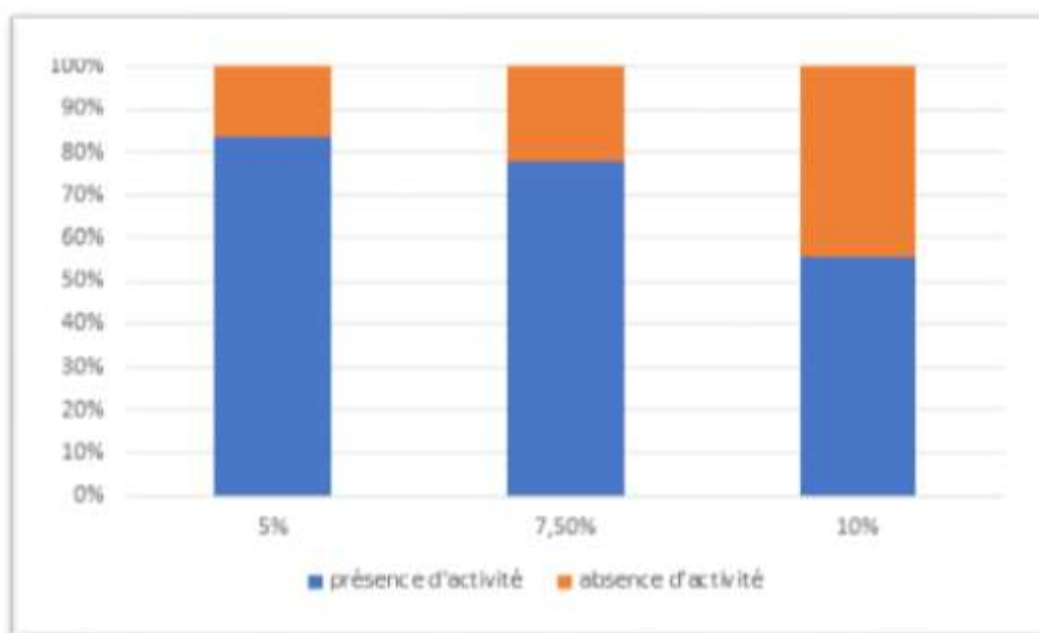


Figure 25 : Histogramme représentant le pourcentage des souches amyolytiques sur les concentrations 5%, 7,5% et 10% d'NaCl.

Résultats et discussion

À partir de l'histogramme de la figure 25, il apparaît que 5% d'NaCl est la meilleure concentration pour le développement de l'activité amylolytique chez 83,3% des isolats, suivit de la concentration 7,5% d'NaCl avec pourcentage 77,7%, puis de la concentration 10% d'NaCl avec un pourcentage de 55,5% des souches.

11.3. Test de coagulation et de peptonisation

Les résultats de l'action des souches actinomycètes sur le lait écrémé additionnés de 5% d'NaCl sont présentés dans le tableau 47.

Tableau 47 : Résultats de l'action de 36 souches actinomycètes sur le lait écrémé additionnés de 5% d'NaCl.

Souches	Coagulation	Peptonisation	Souches	Coagulation	Peptonisation
S3	+	-	S123	-	+
S28	+	-	S124	+	-
S31	+	-	S132	+	-
S45	+	-	S134	-	+
S48	-	+	S140	+	-
S58	+	-	S141	+	-
S69	-	+	S159	-	+
S76	-	+	S168	+	-
S85	-	+	S169	+	-
S87	+	-	S171	+	-
S95	-	+	S172	+	-
S99	+	-	S173	+	-
S106	+	-	S174	+	-
S107	+	-	S178	-	+
S109	+	-	S185	+	-
S110	-	+	S187	+	-
S120	+	-	S188	-	+
S122	+	-	S191	+	-

D'après les résultats de tableau 47, on remarque que la majorité des souches (25 souches) qui représentent 69,44% des souches ont provoqué la coagulation de lait écrémé, tandis que 30,55% des isolats d'actinomycètes (11 souches) sont capables de provoquer une peptonisation de lait écrémé.

Une Coagulation de la caséine se traduit par la formation d'un caillé ou d'un caillot et d'un liquide aqueux appelé "lactosérum" au sommet d'un tube bien coagulé (figure26). Cependant, la peptonisation est due à la digestion des protéines du lait qui se traduit par une clarification du milieu et la dissolution du caillot. Lorsque les actinomycètes sont présents dans le lait

Résultats et discussion

écrémé, ils sécrètent des enzymes qui dégradent les protéines en composés plus petits. Cela entraîne une modification de la texture et de la consistance du lait, le rendant plus liquide et moins visqueux.



Figure 26 : Résultat de la coagulation du lait écrémé par la souche S171.

11.4. Hydrolyse de la caséine

Les résultats de la dégradation de la caséine par les souches actinomycètes sont représentés dans le Tableau 48.

Tableau 48 : Résultats obtenus suite au test de caséinase chez 36 isolats actinomycètes.

Souches	Caséinase	Souches	Caséinase
S3	+	S123	+
S28	+	S124	+
S31	-	S132	-
S45	-	S134	-
S48	-	S140	-
S58	+	S141	-
S69	-	S159	+
S76	+	S168	+
S85	+	S169	-
S87	+	S171	+
S95	+	S172	+
S99	+	S173	+

Résultats et discussion

Tableau 48 : Résultats obtenus suite au test de caséinase chez 36 isolats actinomycètes (Suite).

Souches	Caséinase	Souches	Caséinase
S106	-	S174	+
S107	+	S178	+
S109	+	S185	+
S110	+	S187	+
S120	-	S188	+
S122	-	S191	+

À partir des résultats présentés dans le tableau 48, nous constatons que 66,66% des souches d'actinomycètes sont capables d'hydrolyser la caséine. Cette activité se révèle par une zone transparente claire tout autour de la croissance (figure 27) colonies (Brown *et al.*, 1970). Toutefois, il est important de signaler que la détection de cette zone peut être difficile si la souche produit un pigment diffusible.



Figure 27 : Mise en évidence de l'activité caséinolytique de quelques souches d'actinomycètes.

Conclusion et perspectives

Notre travail est basé sur deux objectifs : le premier consiste en l'isolement des actinomycètes à partir des trois échantillons d'écosystème salin de la région de Ain Djaarir à Khenchela, la deuxième partie est la mise en évidence de la capacité des actinomycètes isolées à produire des enzymes d'intérêt industrielle tels que l'amylase et la caséinase et thérapeutique à titre l'exemple la L-asparaginase.

L'analyse physicochimique des échantillons a révélé que le sol de ce site est neutre à alcalin, extrêmement salin, ayant des taux d'humidité faibles à modérés et des taux de matière organique élevés. La salinité de nos échantillons en fait de ce site un écosystème extrême.

Suite à 18 conditions d'isolement, nous avons pu isoler une flore actinomycète à partir des trois échantillons. Sa charge varie de $2,6 \cdot 10^3$ à $3,6 \cdot 10^5$ UFC/g de sol. Cette flore est en compétition avec une flore bactérienne non filamenteuse dont la charge varie de 10^4 à $2,05 \cdot 10^6$ UFC/g de sol et une flore fongique dont la charge varie de 10^2 à $1,1 \cdot 10^5$ UFC/g de sol.

L'analyse statistique réalisée sur les résultats du dénombrement a révélé la présence d'un effet du milieu de culture sur le nombre des flores actinomycètes et bactérienne isolées. Il s'est avéré que le milieu ISP4 est le plus favorable à l'isolement d'un plus grand nombre d'actinomycètes et du plus faible nombre de la flore bactérienne.

Suit au protocole d'isolement adopté, nous avons pu purifier et conserver 36 isolats dont seuls les isolats S31, S134, S120 et S159 sont halophiles tandis que tous les autres isolats sont halotolérants.

L'étude des caractères cultureux des 36 isolats a révélé que le milieu ISP2 et la concentration 5% d'NaCl sont les plus favorables à la croissance, la sporulation et la production de pigments chez la majorité des isolats.

L'exploration des aptitudes enzymatiques chez les 36 isolats a montré que 86% des actinomycètes sélectionnées secrètent des amylases capables de dégrader l'amidon. Cette étude a révélé également que 63,88% des souches d'actinomycètes sélectionnées sont aptes de produire une L-asparaginase qui peut jouer un rôle de substance anticancéreuse. De plus, nous avons constaté que 66,66% des isolats étudiées secrètent une caséinase, et que 69,44% des souches étudiées sont capables de provoquer une coagulation de lait écrémé.

D'après ces résultats, nous constatons que la majorité des actinomycètes isolés du sol du site d'Ain Djaarir ont une diversité métabolique considérable et sont des producteurs importants d'enzymes aux applications médicales et alimentaires.

Perspectives

L'isolement et l'exploitation des actinomycètes producteurs d'enzymes offrent des perspectives prometteuses pour de nouvelles découvertes et des applications innovantes. Nous espérons dans l'avenir ;

- Identifier les 36 souches Actinomycétales sélectionnées ;
- Explorer d'autres aptitudes à la production de molécules d'intérêt chez nos isolats ;
- Procéder à une optimisation des méthodes de purification et de production des molécules d'intérêt.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Références Bibliographiques

Site Internet 1 :

<https://www.annasronline.com/index>.

Site Internet 2 :

<https://www.google.com/maps/place/djaarir,+bouhmama>

1. Actinobacterial Strains. *Advances in Food and Nutrition Research* Volume 79 ISSN 1043-4526 <http://dx.doi.org/10.1016/bs.afnr.2016.08.002>
2. Ali Mohammed Abdullah Bawazir and Manjula Shantaram , 2018. “Ecology and distribution of actinomycetes in nature – A review”, *International Journal of Current Research*, 10, (6), 71664-71668.
3. Al-shaibani M.M., Radin M Saphira Radin Mohamed., Marzuki S., El Enshasy H.A., Al-Gheethi A., Efaq N., Al-Mekhlafi N. A et Noraziah M.Z. (2021). Biodiversity of Secondary Metabolites Compounds Isolated from Phylum Actinobacteria and Its Therapeutic Applications. *Molecules* 26, 4504. <https://doi.org/10.3390/molecules26154504>
4. Alvarado-Ramírez, L., Rostro-Alanis, M., Rodríguez-Rodríguez, J., Castillo-Zacarías, C., Sosa-Hernández, J. E., Barceló, D., Parra-Saldívar, R. (2021). Exploring current tendencies in techniques and materials for immobilization of laccases–A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 181, 683-696.
5. Barka, E. A., Vatsa, P., Sanchez, L., Gaveau-Vaillant, N., Jacquard, C., Klenk, H. P., ... & van Wezel, G. P. (2016). Taxonomy, physiology, and natural products of Actinobacteria. *Microbiology and molecular biology reviews*, 80(1), 1-43.
6. Basilio, A., Gonzalez, I., Vicente, M. F., Gorrochategui, J., Cabello, A., Gonzalez, A., & Genilloud, O. (2003). Patterns of antimicrobial activities from soil actinomycetes isolated under different conditions of pH and salinity. *Journal of applied microbiology*, 95(4), 814-823.
7. Bhatti AA, Haq S, Bhat RA. Actinomycetes benefaction role in soil and plant health. *Microb Pathog.* (2017) Oct; 111:458-467. doi: 10.1016/j.micpath.2017.09.036. Epub 2017 Sep 18. PMID : 28923606.
8. Bhatti, A. A., Haq, S., & Bhat, R. A. (2017). Actinomycetes benefaction role in soil and plant health. *Microbial pathogenesis*, 111, 458-467.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

9. Boudjellal-bencheikh F. (2012). Taxonomie et antagonisme des actinomycètes halophiles d'origine saharienne et caractérisation des composés bioactifs sécrétés par *Actinoalloteichus* sp. AH97. *Thèse de doctorat en sciences agronomiques*, Ecole nationale supérieure agronomiques El-harrach, Alger. P:26
10. Chaudhary, H. S., Soni, B., Shrivastava, A. R., & Shrivastava, S. (2013). Diversity and versatility of actinomycetes and its role in antibiotic production. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 3(8,), S83-S94.
11. Chergui A. (2018-2019). Sélection de souches d'actinomycètes productrices d'enzymes d'intérêt biotechnologique. *Thèse de doctorat*, Département de Biochimie-Microbiologie, université Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou.
12. Chitrangada D., Sukanti B. M., Prasanta K.M. (2014). Optimization, Purification and Characterization of L- Asparaginase from Actinomycetales bacterium BkSoiiA, *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, DOI: 10.1080/10826068.2014.969437.
13. Cline, J. D., and Richards, F. A. (1969). Oxygenation of hydrogen sulfide in seawater at constant salinity, temperature and pH. *Environmental Science and Technology*, 3(9), 838-843.
14. Djaballah C.E. (2021). Biodiversité des actinomycètes halophiles et halotolérants isolés à partir de trois sites Ramsar situés au niveau de la Wilaya d'Oum El Bouaghi. *Thèse de doctorat*, Département de Microbiologie, Université des Frères Mentouri Constantine 1.
15. Elisandra, M., Luciana, P.M, Martha T. O., Sueli Teresinha, V. D. S. (2014). Enzyme characterization of endophytic Actinobacteria isolated from tomato plants. *Journal of Advanced Scientific Research*, 5(2): 16-23.
16. Embley, T. M., & Stackebrandt, E. (1994). The molecular phylogeny and systematics of the actinomycetes. *Annual review of microbiology*, 48(1), 257-289.
17. Ernest A., MRCSEd, MRCSEng, MSc Surg, MD, Catherine Lloyd, BSc., Rodrigues S.T., R. Steven Conlan., FRSB et Iain S. Whitaker, MA(Cantab) FRCS(Plast). (2016). Clinical applications of amylase: Novel perspectives. *Surgery*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.surg.2016.01.005>
18. Ewald, A. H., Martin, R. L., Ross, I. G., and White, A. H. (1964). Anomalous behaviour at the 6 A 1-2 T 2 crossover in iron (III) complexes. *Proceedings of the Royal Society of London. Series A. Mathematical and Physical Sciences*, 280(1381), 235-257.
19. GOODFELLOW & WILLIAMS Goodfellow, M., and Williams, S. T. (1983). Ecology of Actinomycetes. *Annual Review of Microbiology*, 37(1), 189–216.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

20. Hazarika, S. N., and Thakur, D. (2020). Actinobacteria. *In Beneficial Microbes in Agro-Ecology* (pp. 443-476). Academic Press.
21. *Hindawi BioMed Research International* Volume 2017, Article ID 1272193, 9 pages
22. Hotam Singh Chaudhary, Bhavana Soni, Anju Rawat Shrivastava, Saurabh Shrivastava. (2013) Diversity and Versatility of Actinomycetes and Its Role in Antibiotic Production. *J App Pharm Sci.* 3 (8 Suppl 1): S83-S94.
23. J Suriya., S. Bharathiraja., P. Manivasagan et S.K Kim. (2016). Enzymes From Rare
24. Jorge Javier M. C., Felipe Antonio F. A., Guilherme F.D. P., Larissa P.B., Júlio César D. S., Silvio Silvério D.S. (2016). Current applications and different approaches for Microbial L-asparaginase production. *Brazilian journal of microbiology*,77 :85 <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>
25. Klieneberger-Nobel, E. (1947). The life cycle of spring Actinomyces as revealed by a study of their structure and septation. *Microbiology*, 1(1), 22-32.
26. Lee, J. Y., & Hwang, B. K. (2002). Diversity of antifungal actinomycetes in various vegetative soils of Korea. *Canadian Journal of Microbiology*, 48(5), 407-417.
27. Lewin GR, Carlos C, Chevrette MG, Horn HA, McDonald BR, Stankey RJ, Fox BG, Currie CR. (2016) Evolution and Ecology of Actinobacteria and Their Bioenergy Applications. *Annu Rev Microbiol.*
28. Loucif, K., & Kitouni, M. (2017). Recherche de substances antibactériennes à partir d'une collection de souches d'actinomycètes.
29. Manal Selim Mohamed Selim, Sayeda Abdelrazek Abdelhamid* and Sahar Saleh Mohamed (2021) –A review *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*.
30. Martin, S. M. (1964). *Conservation of Microorganisms. Annual Review of Microbiology*, 18(1), 1–16. Doi :10.1146/annurev.mi.18.100164.
31. Mathieu, C., Pieltain, F., and Jeanroy, E. (2003). Analyse chimique des sols : Méthodes choisies. *Tec and doc*.
32. Mohammadipanah, F., and Dehghani, M. (2017). Classification and taxonomy of Actinobacteria. *Biology and biotechnology of Actinobacteria*, 51-77.
33. Mohsen M.D et Fahime A. (2012). Application of alpha-amylase in Biotechnology, *Journal of Biology and today's world*, volume 1, issue 1, pages: 39-50
34. Noor Nihad A.H., Aseel I.I., Firas H.K., Aurelia C.N. (2020). Caseinase Production and Media Optimization from *Bacillus subtilis*. *Revista de Chimie*, 71 (11) :1-9

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

35. Nouioui I, Carro L, García-López M, Meier-Kolthoff JP, Woyke T, Kyrpides NC, Pukall R, Klenk HP, Goodfellow M, Göker M. (2018) Genome-Based Taxonomic Classification of the Phylum *Actinobacteria*. *Front Microbiol.*;9:2007.doi: 10.3389/fmicb.2018.02007. PMID: 30186281; PMCID: PMC6113628.
36. Oren, A. (2002). Diversity of halophilic microorganisms: environments, phylogeny, physiology, and applications. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 28, 56-63.
37. Pine, L., & Boone, C. J. (1967). Comparative cell wall analyses of morphological forms within the genus *Actinomyces*. *Journal of bacteriology*, 94(4), 875-883.
38. Salwan, R., & Sharma, V. (2020). Molecular and biotechnological aspects of secondary metabolites in actinobacteria. *Microbiological research*, 231, 126374
39. Selamoglu, Z. (2020). Use of enzymes in dairy industry: a review of current progress. *Archives of Razi Institute*, 75(1), 131.
40. Selim, M.S.M., Abdelhamid, S.A. & Mohamed, S.S.(2021). Secondary metabolites and biodiversity of actinomycetes. *J Genet Eng Biotechnol* 19, 72 (2021).
41. Sharma, M., Dangi, P., & Choudhary, M. (2014). Actinomycetes: source, identification, and their applications. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 3(2), 801-832.
42. Shirling, E. T., and Gottlieb, D. (1966). Methods for characterization of *Streptomyces* species. *International journal of systematic bacteriology*, 16(3), 313-340.
43. SMAOUI S. (2010). Purification et caractérisation de biomolécules à partir de microorganismes nouvellement isolés et identifiés. *Institut National Polytechnique de Toulouse*.
44. Subash C., Periasamy A., M. K. Md Arshad., Thangavel L., Chun H.V., Uda H., et SureshV.C.(2017). Biotechnological Processes in Microbial Amylase Production
45. Subramani R., Mahalingam R., Narayanasamy M. (2009). Characterization of a thermostable alkaline protease produced by marine *Streptomyces fungicidicus* MML1614. *Bioprocess Biosyst Eng*, 32 :791–800
46. Ventura, M., Canchaya, C., Tauch, A., Chandra, G., Fitzgerald, G. F., Chater, K. F., & van Sinderen, D. (2007). Genomics of Actinobacteria: tracing the evolutionary history of an ancient phylum. *Microbiology and molecular biology reviews*, 71(3), 495-548.
47. Waksman, S. A. (1940). On the classification of actinomycetes. *Journal of bacteriology*, 39(5), 549-558.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

48. Zaitlin, B., & Watson, S. B. (2006). Actinomycetes in relation to taste and odour in drinking water: myths, tenets and truths. *Water research*, 40(9), 1741-1753

Annexes

Annexe 01

Milieux de cultures

ISP2 modifié

Extrait de levure	4g
Extrait de malt	10g
Glucose	4g
NaCl	50g / 75g / 100g
Eau distillée q.s.p.	1000ml
Agar	20g
PH	8.0

ISP4 modifié

Amidon soluble	10g
K ₂ HPO ₄	1g
MgSO ₄ 7H ₂ O	1g
NaCl	1g
(NH ₄) ₂ SO ₄	2g
CaCO ₃	2g
NaCl	50g / 75g / 100g
Agar	20g
Eau distillée q.s.p.	1000ml
PH	8.0

ISP5 modifié

Glycérol	10g
L-Asparagine	1g
K ₂ HPO ₄	1g
Solution d'oligo-éléments	1ml
NaCl	50g / 75g / 100g
Agar	20g
Eau distillée	1000ml

ANNEXES

PH 8.0

Solution saline 1 (solution d'oligo-éléments) du milieu ISP5

FeSO₄.7H₂O 0.1g

MnCl₂.7H₂O 0.1g

ZnSO₄.7H₂O 0.1g

Eau distillée q.s.p. 100ml

ANNEXES

Annexe 02

Milieux pour les tests enzymatiques

Milieu caséinase

Glycérol	10g
K ₂ HPO ₄	1g
Solution d'oligo-éléments	1ml
NaCl	50g
Agar	20g
Eau distillée	1000ml
Lait écrémé	500ml
PH	8.0

Milieu amylase

Amidon soluble	10g
K ₂ HPO ₄	1g
MgSO ₄ 7H ₂ O	1g
NaCl	1g
(NH ₄) ₂ SO ₄	2g
CaCO ₃	2g
NaCl	50g / 75g / 100g
Agar	20g
Eau distillée q.s.p.	1000ml
PH	8

Milieu M9

Na ₂ HPO ₄	6g
K ₂ HPO ₄	3g
MgSO ₄	2g
KCl	0.1g
Glucose	3g
L-Asparagine	10g

ANNEXES

Rouge de phénol	0.009%(0,09g)
Agar	20g
Eau distillée	1000ml
PH	6,8

Préparation du Lugol

Iodure de potassium (KI)	2g
Diiodure (I ₂)	1g
Eau distillée	100ml