

## EFFET DES MONOSACCHARIDES SUR LA CROISSANCE ET LA PRODUCTION DE CHLORAMPHENICOL CHEZ DEUX SOUCHES DE *SACCHAROTHRIX LONGISPORA* (PAL 54 ET PAL 42) ISOLEES D'UN SOL DE LA PALMERAIE DE GHARDAÏA

K. Hamza<sup>1</sup>, H. Bouali<sup>1</sup>, N. Bouras<sup>1,2\*</sup>, M. Bouallala<sup>3</sup>, B. Badji<sup>1</sup>, H-P Klenk<sup>4</sup>, N. Sabaou<sup>1</sup>

<sup>(1)</sup>Laboratoire de Biologie des Systèmes Microbiens (LBSM), Ecole Normale Supérieure de Kouba, B.P. 92, 16 050, Vieux-Kouba, Alger, Algérie

<sup>(2)</sup>Département de Biologie, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de la Terre, Université de Ghardaïa, BP 455, Ghardaïa 47000, Algérie

<sup>(3)</sup>Département des Sciences de la Nature et de la Vie, Faculté des Sciences et de la Technologie, Université Ahmed Draïa d'Adrar, Adrar 01 000, Algérie

<sup>(4)</sup>School of Biology, Newcastle University, Ridley Building, Newcastle upon Tyne, NE1 7RU, United Kingdom

E-mail: noureddine\_bouras@yahoo.fr

**Résumé.-** Dans ce travail nous nous sommes intéressées aux deux souches de *Saccharothrix longispora* : PAL54 et PAL42 dans le but d'étudier l'effet des monosaccharides sur la croissance et la production du chloramphénicol. Tous les essais ont été effectués en double et chaque valeur représente la moyenne de deux essais. Les microorganismes-cibles choisis sont *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (bactérie à Gram positif, sensible aux antibiotiques) et *Klebsiella pneumoniae* E40 (bactérie à Gram négatif, multi-résistante aux antibiotiques) pour les deux souches PAL42 et PAL54, et pour les quatre monosaccharides choisis (l'arabinose, le glucose, le galactose et le fructose). D'après les résultats obtenus, la source de carbone a une grande influence sur la croissance de deux souches actinobactériennes et également sur la production de l'antibiotique (chloramphénicol) du point de vue quantitatif.

**Mots clés:** *Saccharothrix*, monosaccharide, croissance, biomasse, antibiotique, chloramphénicol.

**Abstrat.-** In this work we are interested in two strains of *Saccharothrix longispora*: PAL54 and PAL42 in order to study the effect of monosaccharides on the growth and production of chloramphenicol. All experiments were carried out in duplicate and each value represents the average of two values. The target microorganisms selected are *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (Gram-positive bacteria, antibiotic-sensitive) and *Klebsiella pneumoniae* E40 (Gram-negative bacteria, multi-resistant to antibiotics) which were used with the two strains PAL42 and PAL54, and for four selected monosaccharides (arabinose, glucose, galactose and fructose). From the results obtained, the carbon source has a great influence on the growth of two actinobacterial strains and also on the production of the antibiotic (chloramphenicol) from the quantitative point of view.

**Keywords:** *Saccharothrix*, monosaccharide, growth, biomass, antibiotic, chloramphenicol.

### INTRODUCTION

Les microorganismes du sol jouent le rôle de biotransformation en utilisant une gamme de métabolites diverse. Ils participent ainsi à la structuration du sol et au recyclage du carbone organique. L'ensemble de ces échanges occasionnent une modification des équilibres ioniques et gazeux de la rhizosphère [1].

La rhizosphère se décompose en trois zones : l'endorhizosphère (tissus racinaires), le rhizoplan (surface des racines) et l'ectorhizosphère (sol adhérent aux racines c'est-à-dire sol rhizosphérique). La rhizosphère est caractérisée par sa richesse en nutriments de nature diverse et variée. Il en résulte une abondance de microorganismes (procaryotes et eucaryotes) et une stimulation de nombreuses activités métaboliques. C'est ainsi que

plusieurs chercheurs ont indiqué que les bactéries sont 5 à 50 fois plus abondantes dans la rhizosphère que dans le reste du sol [2].

Le processus de rhizodéposition (l'apport trophique des racines à la rhizosphère) apparaît comme un flux énergétique d'une importance capitale pour le maintien des activités métaboliques dans la rhizosphère [3]. Il joue également un rôle régulateur des populations microbiennes en favorisant les antagonistes des phytopathogènes [4]. A titre d'exemple, la prédominance de *Paenibacillus polymyxa* dans la rhizosphère du blé [5]. Cette bactérie a été étudiée pour ses nombreuses applications dans les interactions plantes-bactéries comme le pouvoir antagoniste vis-à-vis de certains microorganismes phytopathogènes [6].

L'effet de la pression de sélection a été signalé par de nombreuses études. ATLAS et BARTHA [7] ont rapporté qu'il y a une différence dans la composition des populations bactériennes de la rhizosphère et celles d'un sol nu qui n'a pas été influencé par les racines de plantes vivantes.

En plus de certaines vitamines, acides organiques, acides aminés, les plantes exsudent également les glucides. Les glucides simples comme le glucose, le xylose et l'arabinose sont présents dans la rhizosphère du blé [8]. Il est à noter que le saccharose et le glucose sont décrits dans la littérature comme étant des glucides abondamment exsudés dans la rhizosphère de certaines plantes comme le blé [9]. Les glucides dans la rhizosphère de certaines graminées présente un comportement paradoxal bien qu'ils soient facilement biodégradables, ils sont relativement abondants dans le sol et représentent 10% du carbone des photosynthétats [8].

Les actinobactéries sont des bactéries mycéliennes à Gram positif, généralement aérobies et mésophiles. Ces microorganismes constituent l'un des plus grands groupes de la population microbienne du sol. Ils sont capables de dégrader les résidus organiques récalcitrants telles que la lignine, la cellulose et la chitine, et contribuent ainsi à la fertilisation des sols [10]. Par ailleurs, grâce à leurs propriétés antagonistes, les actinobactéries sont utilisés dans la lutte biologique pour la protection de certaines plantes contre les maladies fongiques et bactériennes [11]. Cependant, les actinobactéries sont surtout réputés pour la production d'un nombre important d'antibiotiques, et près de 50% des molécules actives connues et d'origine microbienne sont sécrétées par ce phylum de microorganismes [12].

L'une des pistes exploitées consiste en l'exploration d'écosystèmes arides (principalement désertiques), souvent ignorés par le passé [13].

Des espèces et souches appartenant à des genres rares ou peu fréquents comme *Saccharothrix*, *Nocardiopsis*, *Actinomadura*, *Streptosporangium*, *Planomonospora*, *Actinoplanes*, *Actinokineospora*, *Actinoalloteichus*, *Amycolatopsis*, *Microbispora*, *Microtetraspora*, *Nonomuraea*, *Planobispora*, *Planomonospora*, *Pseudonocardia*, *Saccharomonospora*, etc. (c'est-à-dire autres que le genre *Streptomyces*) sont isolées et étudiées.

Parmi les actinobactéries rares, deux souches de *Saccharothrix longispora* : PAL54 et PAL42, ont été isolées à partir d'un sol rhizosphérique du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) de la région de Béni-Isguen (Ghardaïa, Mزاب, Sahara Septentrional) sur un milieu sélectif à base de chitine et de vitamines B [14]. Les travaux menés

auparavant ont montré qu'elles produisent toutes les deux du chloramphénicol, un antibactérien de la famille des phénicolés [15].

Le chloramphénicol ( $C_{11}H_{12}Cl_2N_2O_5$ ), isolé en 1947 à partir de *Streptomyces venezuelae*, est un antibiotique bactériostatique de la famille des phénicolés. Cet antibiotique peut être utilisé pour traiter le choléra (*Vibrio cholerae*), la méningite (*Streptococcus agalactiae* et *Neisseria meningitidis*), la peste (*Yersinia pestis*), la fièvre typhoïde (*Salmonella enterica*) uniquement lorsque les antibiotiques plus sûrs ne peuvent pas être employés [16]. C'est une substance solide cristallisée inodore, très peu soluble dans l'eau (<2,5 g/L à 20 °C). Sa structure est représentée dans la Figure 1.

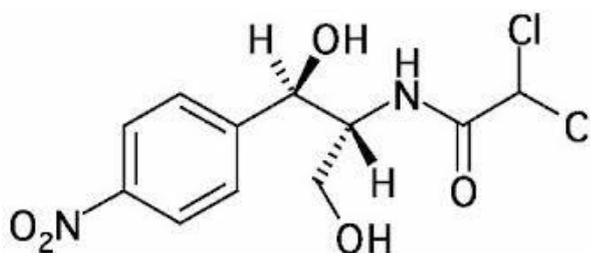


Fig. 1. Structure du chloramphénicol.

Nous nous sommes intéressées aux deux souches de *Saccharothrix longispora* : PAL54 et PAL42 dans le but d'étudier et d'optimiser la production du chloramphénicol en recherchant les meilleurs milieux de culture qui favorisent aussi bien cette production que la croissance des deux souches d'actinobactéries.

## MATERIEL ET METHODES

### Souches d'actinobactéries

Les deux souches de *Saccharothrix longispora* (PAL54 et PAL42) ont été isolées à partir des échantillons de sols rhizosphérique du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) provenant de la palmeraie de Youcef Bakir Hadj Saïd, Oudjoujen (Béni-Isguen, Ghardaïa, Mزاب). Les deux souches sont productrices de l'antibiotique bactériostatique chloramphénicol [11 15].

### Souche de microorganismes-cibles

Les microorganismes-cibles utilisés sont les suivants: Une bactérie à Gram positif: *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), et une bactérie à Gram négatif *Klebsiella pneumoniae* (E40), elles sont conservées à 4 °C sur milieu solide ISP2. Ces bactéries proviennent, respectivement, de la collection du Laboratoire de Biologie Cellulaire et Moléculaire, Université des Sciences et de la Technologie Houari Boumédiène (USTHB), Alger, et du Laboratoire de Microbiologie Appliquée (LMA), Université Abderrahmane Mira de Béjaïa. Les profils de résistance de ces bactéries vis-à-vis de plusieurs antibiotiques sont indiqués dans le Tableau 1.

**Tableau 1.** Profils de résistance des bactéries-cibles utilisées [17,18].

| Bactérie cible                       | Résistance à:                                | Sensibilité à:                                |
|--------------------------------------|--|---|
| <i>Bacillus subtilis</i> (ATCC 6633) | NEO.   | C, CAR, CHL, ERY, GEN, K, RIF, SPI, SSS, VAN. |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> (E40)   | AMX, CAZ, CFP, CTX, FEP, GEN, PIP, TIC, TOB. | AMC, ATM, C, CXC, TCC.                        |

**Légende:** ATCC: American Type Culture Collection. AMC: Amoxicilline + clavulanate, ATM: Aztréonam, AMX: Amoxicilline, C: Chloramphénicol, CAR: Carbénicilline, CAZ: Ceftazidime, CFP: Cefpirome, CHL: Chlorotétracycline, CTX: Céfotaxime, CXC: Céfotaxime + Clavulanate, ERY: Erytromycine, FEP: Céfépime, GEN: Gentamicine, K: Kanamycine, NEO: Néomycine, PIP: Pipéracilline, RIF: Rifampicine, SPI: Spiramycine, SSS: Sulfamide, TCC: Ticarcilline + Clavulanate, TIC: Ticarcilline, TOB: Tobramycine, VAN: Vancomycine.

### Milieu de culture et stérilisation

Le milieu de culture semi-synthétique liquide (MSS1) utilisé est composé de : D-glucose: 10 g, extrait de levure: 2 g, NaCl: 2 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: 0,5 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>: 1 g, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0,2 g, CaCO<sub>3</sub>: 5 g, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>: 2 g, eau distillée q.s.p. 1 L; pH = 7,2 [19].

Les souches (PAL54 et PAL42) sont conservées à 4 °C sur milieu ISP2 [20] solide (contenant 18 g/L d'agar).

La stérilisation des milieux de culture s'effectue à 120 °C dans un autoclave. Les fioles Erlenmeyer de 500 ou de 250 mL et contenant respectivement 100 ou 50 mL de milieu, sont stérilisées pendant 20 min à 120 °C (sous 1 bar).

### Conditions de fermentation

La cinétique de production des antibiotiques (par les deux souches) a été réalisée, et l'évolution de l'activité antibactérienne, du pH et du poids sec du mycélium est suivie quotidiennement. Tous les essais ont été effectués en double et chaque valeur représente la moyenne de deux essais ( $\pm$  écarts-types).

Des pré-cultures sont préparées à partir de cultures mûres des souches de *Saccharothrix longispora* (PAL54 ou PAL42) âgées de 10 j et poussant sur milieu solide ISP2. La surface des colonies est raclée à partir d'une culture en boîte de Pétri. Les Erlenmeyers de 500 mL contenant chacun 100 mL de milieu liquide ISP2 sont inoculées (pour chaque souche). L'incubation se fera pendant 2 à 3 jours dans un agitateur (Shaker New Brunswick, agitation de 250 rpm) à une température de 30 °C.

Des fioles d'Erlenmeyer de 500 mL contenant chacune 100 mL de milieu liquide (pH 7,2) sont ensemencées chacune avec 0,1 g ( $\pm$  0,02 g) d'actinobactérie contenu dans 5 mL de la pré-culture. Les cultures sont incubées à 30 °C et agitées à 250 rpm dans un agitateur pendant une période de 9 jours. Cette durée correspond à la production maximale de substances actives produites par les deux souches de *Saccharothrix* (constatation faite lors d'études préliminaires).

Pendant les 9 jours d'incubation, 4 mL (2 mL en double) de chaque milieu de cultures sont prélevés à des intervalles de temps fixe (de 48 h) dans des conditions aseptiques, dans des tubes Eppendorf de 2 mL afin d'évaluer les variations de la biomasse, du pH et de l'activité antibactérienne vis-à-vis des deux microorganismes cibles.

Les tubes Eppendorf contenant les filtrats de cultures sont centrifugés à 12000 rpm (Centrifuge 54 15 R) pendant 10 min. Les surnageants obtenus sont utilisés pour enregistrer, grâce à un pH mètre (HANNA instruments), les variations de pH au cours du temps.

### **Estimation de la biomasse**

L'évolution de la biomasse durant la fermentation est estimée selon la méthode de PFEFFERLE [21] avec quelques modifications.

### **Détermination de l'activité antimicrobienne globale des antibiotiques**

Les tubes Eppendorf contenant les filtrats de cultures sont centrifugés à 12000 rpm pendant 10 min. Les surnageants sont récupérés et vont servir pour déterminer l'activité antibactérienne par la méthode des puits.

Deux cent microlitres de filtrat de culture de l'actinobactérie sont prélevés quotidiennement à l'aide d'une micropipette dans des conditions stériles, puis déposés dans un puits de 10 mm de diamètre, sur milieu ISP2 (en surfusion à 45 °C, et contenant 12 g/L d'agar) afin de permettre une bonne diffusion de l'antibiotique préalablement ensemencé par le germe-cible (*Bacillus subtilis* ATCC 6633 et *Klebsiella pneumoniae* E40) et coulé dans une boîte de Pétri (90 mm de diamètre). Les boîtes de Pétri sont gardées à 4 °C durant 3 h de manière à inhiber momentanément la croissance des germes-cibles tout en permettant la diffusion des antibiotiques. Ensuite, les boîtes sont incubées pendant 24 h dans l'étuve (à 28 °C); le diamètre des zones d'inhibition des germes est ensuite mesuré. L'activité antibactérienne est estimée par la mesure du diamètre de l'auréole d'inhibition du germe-cible autour des puits.

## **RESULTATS**

### **Etude de l'influence des sources de carbone sur la croissance et la production du chloramphénicol en milieu liquide MSS1**

La cinétique de croissance, de pH et de production des antibiotiques de deux souches (PAL54, PAL42) a été suivie durant 14 jours en milieu liquide agité (250 rpm, 30°C). Le milieu MSS1 a été choisie et additionné de différentes sources de carbones dans le but d'étudier l'effet de ces derniers sur la croissance et la production d'antibiotique.

Les sources de carbone utilisées dans notre étude sont: l'arabinose, le glucose, le galactose et le fructose (c'est-à-dire quatre glucides mono saccharidiques).

#### **Arabinose**

Les cinétiques de croissance, de pH et de production des antibiotiques de la souche PAL54 et de la souche PAL42 en milieu MSS1 additionné de l'arabinose sont illustrées par la Figure 2.

#### **Souche PAL54**

La courbe de croissance débute par une phase exponentielle qui dure 4 jours (J0 à J4). Un long ralentissement est observé entre J4 et J8. Par la suite, une phase de déclin a lieu, entre J8 et J10. Nous remarquons ensuite une légère croissance entre J10 et J14 due certainement à une croissance cryptique. Le maximum de biomasse est atteint le 8<sup>ème</sup> jour avec un poids sec de 17,37 g/L.

Le pH se basifie durant la phase exponentielle et durant le ralentissement de la croissance. Par la suite, le pH s'acidifie lentement jusqu'au dernier jour de la cinétique.

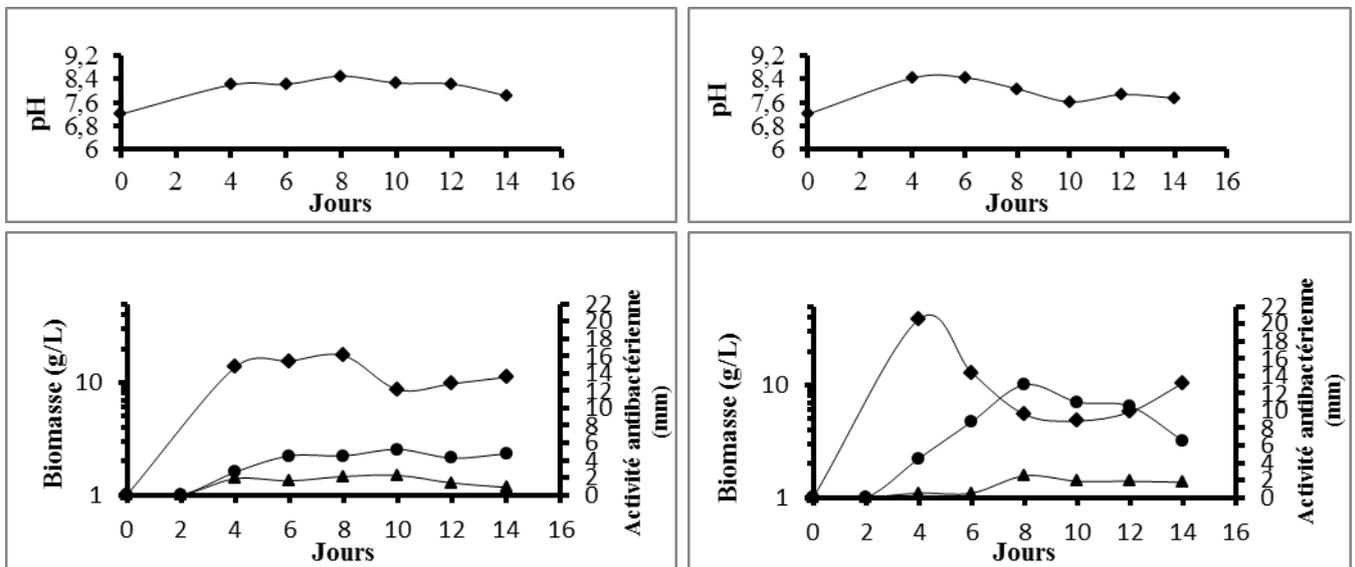
L'activité antibactérienne débute le 2<sup>ème</sup> jour contre les deux germes-cibles choisis. Elle est maximale à la fin de la phase de déclin au 10<sup>ème</sup> jour. La production reste stable est trop faible contre les deux germes-cibles, mais l'activité est meilleure contre *B. subtilis*.

### Souche PAL42

La courbe de croissance débute directement par une phase exponentielle qui dure 4 jours (J0 à J4). Une phase de déclin assez brusque est directement observée entre J4 et J10 (avec une légère stabilisation entre J8 et J10). Par la suite, nous remarquons une croissance un peu plus forte que celle observé chez la souche PAL54 entre J10 et J14 qui explique la présence d'une croissance cryptique. Le maximum de production pour la souche PAL42 a été atteint le 4<sup>ème</sup> jour avec un poids sec de 38,67 g/L, contrairement à la souche PAL54 qui a donné une croissance moindre dans les mêmes conditions.

La courbe de pH de la souche PAL42 diffère de celle de la souche PAL54, le pH augmente (se basifie) durant les deux phases exponentielle et de déclin. A la fin de la phase de déclin, le pH s'acidifie lentement. Durant la seconde phase exponentielle, le pH augmente légèrement puis baisse à nouveau tout en restant acide.

L'activité antibiotique débute le 2<sup>ème</sup> jour contre *B. subtilis* et elle est presque nulle contre *K. pneumoniae* jusqu'au 6<sup>ème</sup> jour. Elle est maximale à la fin de la phase de déclin (le 8<sup>ème</sup> jour) pour les deux germes-cible. La production commence à diminuer surtout lors de la seconde phase exponentielle. La production chez cette souche (PAL42) a été meilleure que la souche PAL54. L'activité est meilleure contre *B. subtilis*.



**Fig. 2.** Cinétiques de production des activités antibactériennes et évolution du pH et de la biomasse de la souche PAL54 (à gauche) et celle de la souche PAL42 (à droite) en milieu liquide MSS1 additionné de l'arabinose.

Légendes: ♦, biomasse; ●, activité contre *B. subtilis*; ▲, activité contre *K. pneumoniae*.

### Glucose

Les cinétiques de croissance, de pH et de production des antibiotiques de la souche PAL54 et de la souche PAL42 en milieu MSS1 additionné de glucose sont illustrées par la Figure 3.

#### Souche PAL54

La courbe de croissance débute par une phase exponentielle qui dure 4 jours (J0 à J4). Une phase de déclin lente, est directement observée entre J4 et J10, mais assez brusque entre J8 et J10. Par la suite, une phase de croissance est observée entre J10 et J12 qui s'explique par une croissance cryptique, pour laisser encore place à une phase de déclin. Le maximum de biomasse est atteint le 4<sup>ème</sup> jour avec un poids sec de 36,82 g/L.

Le pH se basifie durant la phase exponentielle jusqu'à un pH de 8,2. Malgré les multiples variations durant la cinétique, le pH est resté basique jusqu'au dernier jour.

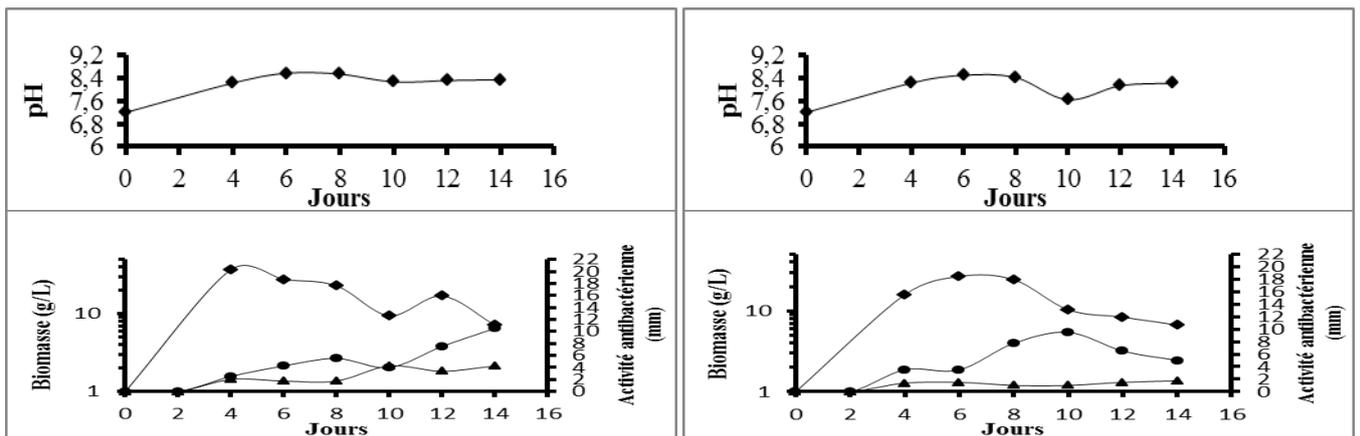
L'activité antibactérienne débute le 2<sup>ème</sup> jour contre les deux germes-cibles. La production se passe en deux étapes, le premier est maximal lors de la première phase de déclin, entre le 8<sup>ème</sup> et le 10<sup>ème</sup> jour selon les germes-cibles, la seconde est maximale durant la deuxième phase de déclin, le 14<sup>ème</sup> jour pour les deux germes-cibles, et c'est la production maximale pour la souche. L'activité est meilleure contre *B. subtilis*.

#### Souche PAL42

La courbe de croissance débute par une phase exponentielle qui dure 4 jours (J0 à J4). Un ralentissement est observé entre J4 et J6 puis une phase stationnaire courte de deux jours. Par la suite, une phase de déclin jusqu'au 14<sup>ème</sup> jour avec une stabilisation entre j 10 et j 12. Nous avons remarqué l'absence de la croissance cryptique à la différence de la souche PAL54. La biomasse est nettement meilleure avec ce sucre chez la souche PAL54, vu que le maximum de biomasse est de 26,67 au 6<sup>ème</sup> jour.

Le pH de la souche PAL42 suit exactement la même courbe de tendance que celle de la souche PAL54.

L'activité antibiotique débute le 2<sup>ème</sup> jour contre *B. subtilis* et *K. pneumoniae*. Elle est maximale durant la phase de déclin selon le germe-cible. L'activité est meilleure contre *B. subtilis*.



**Fig. 3.** Cinétiques de production des activités antibactériennes et évolution du pH et de la biomasse de la souche PAL54 (à gauche) et celle de la souche PAL42 (à droite) en milieu liquide MSS1 additionné de glucose.

Légendes: ◆, biomasse; ●, activité contre *B. subtilis*; ▲, activité contre *K. pneumoniae*.

### Fructose

Les cinétiques de croissance, de pH et de production des antibiotiques de la souche PAL54 et de la souche PAL42 en milieu MSS1 additionné de fructose sont illustrées par la Figure 4.

#### Souche PAL54

La courbe de croissance débute par une phase exponentielle qui dure 4 jours. Par la suite une phase stationnaire assez longue est observée entre J4 et J8. La phase de déclin commence le 8<sup>ème</sup> jour, avec une stabilisation de la croissance entre J10 et J12. Le fructose s'est révélé moins bon pour la production de la biomasse de la souche PAL54, le maximum de poids sec est de 23 g/L, il est atteint le 6<sup>ème</sup> jour.

Durant la croissance, le pH se basifie durant la phase exponentielle (7,2 à 8,49) puis commence à baisser mais tout en restant basique durant la phase stationnaire. Le dernier jour de la cinétique, le pH s'acidifie à une valeur de 7,6.

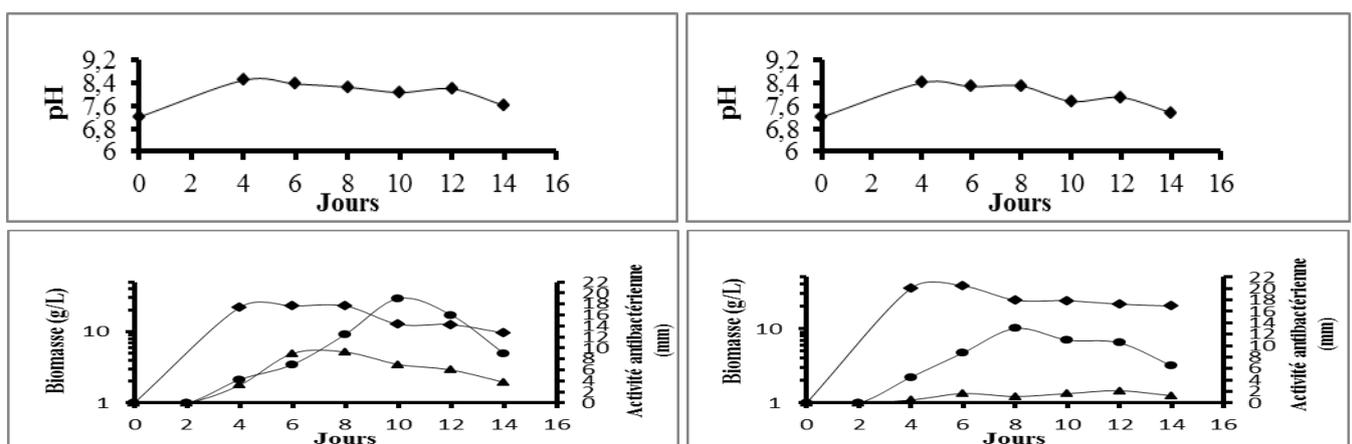
L'activité antibiotique débute le 2<sup>ème</sup> jour contre *B. subtilis* et *K. pneumoniae*. Elle est maximale durant la phase de déclin, entre les 8<sup>ème</sup> et 10<sup>ème</sup> jours selon le microorganisme-cible. L'activité est meilleure contre *B. subtilis*.

#### Souche PAL42

La courbe de croissance débute par une phase exponentielle qui dure 4 jours (J0 à J4). Par la suite une phase stationnaire de 2 jours est observée entre J4 et J6. La phase de déclin commence le 6<sup>ème</sup> jours (avec une stabilisation entre J8 et J14). La biomasse produite est nettement meilleur que celle de la souche PAL54 car la croissance a atteint un poids sec de 37,77 g/L au 6<sup>ème</sup> jour.

Durant la croissance, le pH se basifie durant la phase exponentielle (7,2 à 8,4) et se maintient durant la phase stationnaire malgré une légère baisse. Durant la phase de déclin, le pH s'acidifie au 10<sup>ème</sup> jour et se stabilise jusqu'au 14<sup>ème</sup> jour malgré de légère fluctuation.

L'activité antibiotique débute le 2<sup>ème</sup> jour contre *B. subtilis* et le 4<sup>ème</sup> jour contre *K. pneumoniae*. Elle est maximale durant la phase de déclin, entre les 8<sup>ème</sup> et 12<sup>ème</sup> jours selon le microorganisme-cible. L'activité est meilleure contre *B. subtilis*. La production de la souche PAL54 est nettement meilleure que la production de la souche PAL42.



**Fig. 4.** Cinétiques de production des activités antibactériennes et évolution du pH et de la biomasse de la souche PAL54 (à gauche) et celle de la souche PAL42 (à droite) en milieu liquide MSS1 additionné de fructose.

Légendes: ♦, biomasse; ●, activité contre *B. subtilis*; ▲, activité contre *K. pneumoniae*.

### Galactose

Les cinétiques de croissance, de pH et de production des antibiotiques de la souche PAL54 et de la souche PAL42 en milieu MSS1 additionné de galactose sont illustrées par la Figure 5.

#### Souche PAL54

La courbe de croissance débute par une phase exponentielle qui dure 4 jours, suivie par une phase de déclin très lente (avec un taux de croissance presque nulle entre j4 et j6), qui se poursuit jusqu'au 12<sup>ème</sup>. Une légère croissance est remarquée entre J12 et J14 qui s'explique par une croissance cryptique. La biomasse a atteint un poids sec de 26,12 g/L au 6<sup>ème</sup> jour.

Le pH se basifie à un pH = 8,5. Il baisse par la suite et atteint un pH de 7,97 au 12<sup>ème</sup> jour, mais il augmente légèrement à nouveau durant la croissance cryptique.

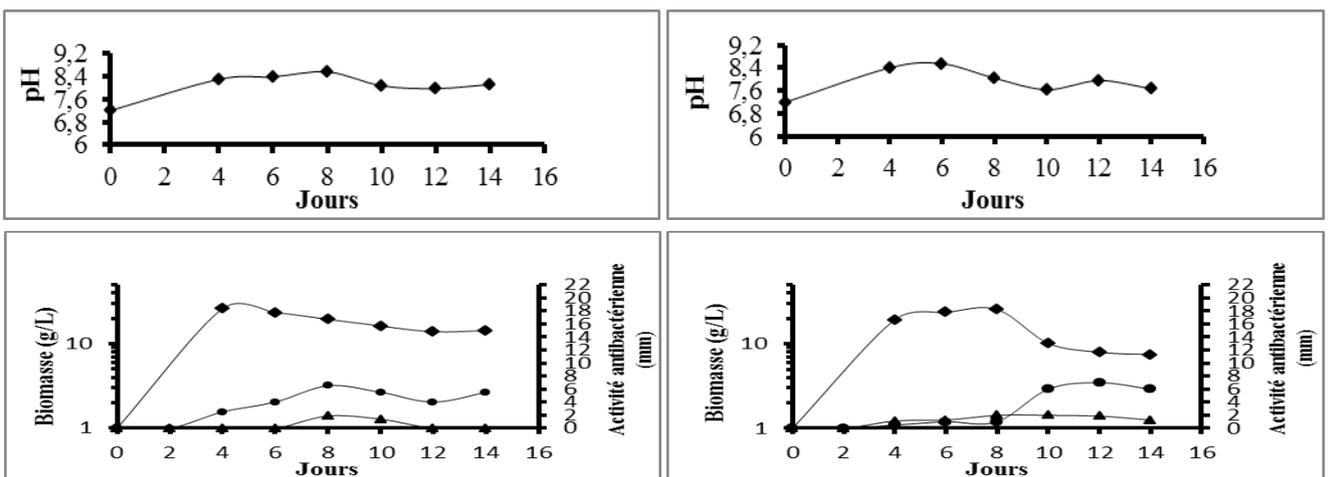
L'activité antibiotique débute le 2<sup>ème</sup> jour contre *B. subtilis* et le 6<sup>ème</sup> jour contre *K. pneumoniae*. La production est maximale au milieu de la phase de déclin, au 8<sup>ème</sup> jour. L'activité est meilleure contre *B. subtilis*.

#### Souche PAL42

La croissance de la souche PAL42 n'a pas suivie la même courbe avec celle de la souche PAL54. En revanche le taux de croissance est similaire entre elles. La courbe de croissance débute par une phase exponentielle de 4 jours (J0 à J4) avec un ralentissement J4 et J6. Une phase stationnaire bref de deux jours est observée, suivie d'une phase de déclin assez brusque entre J8 et J10, qui se stabilise par la suite.

Durant la phase exponentielle le pH se basifie (7,2 à 8,5), puis baisse pour se stabiliser au tour de 7 jusqu'au dernier jour de la cinétique.

L'activité antibiotique débute le 2<sup>ème</sup> jour contre *B. subtilis* et le 4<sup>ème</sup> jour et *K. pneumoniae*. Elle est maximale durant la phase de déclin, entre les 8<sup>ème</sup> et 12<sup>ème</sup> jours selon le microorganisme-cible. L'activité est meilleure contre *B. subtilis*. Nous avons remarqué aussi que la production était trop faible avec le galactose pour les deux souches.



**Fig. 5.** Cinétiques de production des activités antibactériennes et évolution du pH et de la biomasse de la souche PAL54 (à gauche) et celle de la souche PAL42 (à droite) en milieu liquide MSS1 additionné de galactose.

Légendes: ◆, biomasse; ●, activité contre *B. subtilis*; ▲, activité contre *K. pneumoniae*.

## DISCUSSION

La rhizosphère est caractérisée par sa richesse en nutriments de nature diverse et variée. Il en résulte une abondance de microorganismes (principalement, bactéries et champignons) et une stimulation de nombreuses activités métaboliques. C'est ainsi que plusieurs chercheurs ont indiqué que les bactéries sont 5 à 50 fois plus abondantes dans la rhizosphère que dans le reste du sol [2]. La rhizosphère représente le siège d'une intense activité microbienne, nécessaire à la transformation des éléments, elle participe également aux cycles biogéochimiques [22].

La croissance des souches PAL54 et PAL42 (mesure des poids secs) et leur activité antibactérienne ont été suivies en présence de 4 monosaccharides (prises séparément) ajoutées à une concentration de 10 g/L au milieu semi-synthétique MSS1. Les mesures ont été effectuées durant 14 jours.

Les sucres ont ainsi été subdivisés en deux groupes selon les cinétiques de croissance. Le premier groupe comprend un seul sucre, le galactose, qui donne une biomasse moyennement importante pour les deux souches, comprise entre 20 et 30 g/L. Le deuxième groupe (biomasse inférieur à 20 g/L) comprend les sucres qui donnent des résultats différents entre les deux souches (l'arabinose, le glucose et le fructose). En effet, l'arabinose a donné une biomasse plus importante pour la souche PAL42 (38,7 g/L) par rapport à PAL54 (17,37 g/L). Le fructose stimule mieux la croissance de la souche PAL42, alors que le glucose est meilleur pour PAL54.

ZITOUNI [23] a obtenu une très bonne croissance de *Saccharothrix* SA 103 en présence de glucose, tout comme pour la souche PAL54, mais contrairement à PAL42. Cependant, l'arabinose a donné une bonne croissance pour la souche SA 103, comme pour la souche PAL42, mais contrairement à PAL54. En revanche, le galactose et le fructose ont donné une croissance très faible pour SA 103 et moyenne pour PAL54 et PAL42.

Les courbes de croissance étaient caractérisées par l'absence de la phase de latence. Ceci peut être dû au fait que nos pré-cultures aient été menées dans les mêmes conditions que les cultures et prises également en phase exponentielle de croissance. Une absence fréquente de la phase stationnaire a aussi été observée chez les deux souches et dans les différentes conditions de cultures, sauf avec le fructose pour PAL54, et avec le fructose, le glucose et le galactose pour PAL42. L'absence de cette phase est très souvent observée chez les actinomycètes [23].

Pour les deux souches étudiées, et dans les différentes conditions, nous avons observé après la phase de déclin une croissance additive (assez faible), appelée communément croissance cryptique, laquelle a été déjà signalée chez plusieurs microorganismes, notamment chez les entérobactéries [24]. Cette croissance cryptique peut être expliquée par le fait que les cellules encore vivantes utilisent comme substrat les débris des cellules mortes qui se sont lysées durant la phase de déclin. Ce phénomène a aussi été observé chez plusieurs souches de *Streptomyces* [25,26].

L'évolution du pH au cours de l'incubation présente une variation assez légère (une basification, puis une acidification et enfin une remontée progressive du pH), entre 7,2 et 8,8, durant les 14 jours de fermentation. L'acidification serait due à la dégradation des glucides présents dans les milieux (sources de carbone). La dégradation des sources azotées organiques, tels que les acides aminés présents dans l'extrait de levure, induit la basification du milieu après libération et accumulation de l'ammoniac, et ce, suite à une désamination de ces acides aminés. De telles constatations ont été énoncées par STRUB [27] pour expliquer l'augmentation du pH par l'apparition des ions ammonium dans la

culture de *Saccharothrix algeriensis* lors de la croissance et de la synthèse des antibiotiques.

L'effet des sources de carbone sur la production de l'antibiotique a également permis la répartition de ces sources en deux groupes, en notant certains points communs entre les deux souches. Le premier groupe comprend le glucose et le saccharose; et le deuxième, le galactose. En revanche, certaines différences ont été observées. Le fructose a donné une très bonne production d'antibiotique pour la souche PAL54, contrairement à PAL42 dont la production a été tout juste moyenne. L'arabinose a permis une très bonne production à la souche PAL42 contrairement à PAL54 qui a donné une faible production. La source de carbone a donc une grande influence sur la production de l'antibiotique (chloramphénicol) du point de vue quantitatif.

De nombreuses études ont été élaborées dans ce contexte sur l'effet des sources de carbone sur la production des antibiotiques. Par exemple, le fructose s'est révélé être meilleur que le glucose pour la production de la nystatine par *Streptomyces noursei* [28]. Ceci a également été constaté chez la souche PAL54, mais pas chez PAL42, pour laquelle le fructose et le glucose, ont donné le même résultat. La production d'antibiotiques par *Streptomyces lilaceus* TN17 est nettement stimulée par le glucose par rapport au fructose, et ce, contrairement à ce qui a été trouvé dans le cas présent pour les souches PAL54 et PAL42.

## REFERENCES

- [1]. Lemanceau P., Heulin T., 1998 - La rhizosphère. In: P. Stengel , S. Gelin , Sol Interface Fragile. p. 93-106.
- [2]. Lynch J.M., Wipps J.M., 1990 - Substrate flow in the rhizosphere. Plant and Soil. 129, 1-10.
- [3]. Wardle D.A., Van Der Putten W.H., 2002 - Biodiversity, ecosystem functioning and above-ground-below-ground linkages. In Biodiversity and ecosystem functioning synthesis and perspectives. Loreau M., Naeem S., Inchausti P. Ed. Oxford University Press: 155-168.
- [4]. Brimecombe M.J., De Leij F.A., Lynch J.M., 2000 - The effect of root exudates on rhizosphere microbial populations. In The Rhizosphere, Biochemistry and Organic Substances at the Soil– Plant Interface (eds R. Pinton, Z. Varini, P. Nannipieri), pp. 95-140. Marcel Dekker, New York, NY, USA.
- [5]. Gouzou L., Burtin G., Philippon R., Bartoli F., Heulin T., 1993 - Effect of inoculation with *Bacillus polymyxa* on soil aggregation in the wheat rhizosphere: preliminary examination. Geoderma 56, 479-491.
- [6]. Beatty P.H., Jensen S.E., 2002 - *Paenibacillus polymyxa* produces fusaricidin-type antifungal antibiotics active against *Leptosphaeria maculans*, the causative agent of blackleg disease of canola. Can. J. Microbiol. 48, 159-169.
- [7]. Atlas R.M., Bartha R., 1987 - Microbial ecology: Fundamentals and applications. Benjamin. Cummins Publ. Menlo Park CA.
- [8]. Derrien D., Marol C., Balesdent J., 2004 - The dynamics of neutral sugars in the rhizosphere of wheat. An approach by <sup>13</sup>C pulse-labelling and GC/C/IRMS. Plant and Soil, 267, 243-253.

- [9]. Kaci Y., 1987 - Isolement de bactéries diazotrophes de la rhizosphère du blé dur: évaluation de leur activité nitrogénasique *in vitro*. Thèse de Magister en Biologie des sols, Option : Microbiologie du sol. ISN/USTHB : 84.
- [10]. Lacey J., 1997 - Actinomycetes in composts. Ann. Agric. Environ. Med., 4, 113–121.
- [11]. Goodfellow M., Williams S.T., 1983 - Ecology of actinomycetes. Ann. Rev. Microbiol, 37, 189-216.
- [12]. Solecka J., Zajko J., Postek M, Rajnisz A., 2012 - Biologically active secondary metabolites from Actinomycetes. Cen. Europ. J Biol., 7, 373-39.
- [13]. Phoebe, C.H., Cambie, J., Albert, F.G., Van Tran, K., Cabrera, J., Correira, H.J., Guo, Y., Lindermuth, J., 2001 - Extremophilic organisms as an unexplored source of antifungal compounds. Journal of Antibiotics. 54, 56-65.
- [14]. Aouiche A., 2010 - Recherche sur les actinomycètes des sols de Ghardaïa antagonistes de microorganismes pathogènes et toxigènes pour l’homme: isolement, taxonomie et caractérisation des molécules actives. Mémoire de Magister en microbiologie, Université de Sidi Bel-Abbes. 127 p.
- [15]. Aouiche A, Sabaou N, Meklat A, Zitouni A, Bijani C, Mathieu F, Lebrihi A., 2012 - *Saccharothrix* sp. PAL54, a new chloramphenicol-producing strain isolated from a Saharan soil. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 28, 943-951.
- [16]. Powell D.A., and Nahata M.C., 1982 - Chloramphenicol: new perspectives on an old Drug intelligence and clinical pharmacy, 16, 295-300.
- [17]. Touati A., 2006 - Caractérisation des phénotypes de résistance acquis aux  $\beta$ -lactamines des souches d’entérobactéries isolées dans les hôpitaux de Bejaia. Doctorat soutenu à l’Université A. Mira de Bejaia.
- [18]. Messai Y., Iabadene H., Benhassine T., Alouache S., Tazir M., Guatier V., Arlet G. and Bakour R., 2008 - Prevalence and characterization of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases *Klebsiella pneumoniae* in Algiers hospitals (Algeria). Pathologie Biologie, 56, 319-325.
- [19]. Bouras N., Mathieu F., Sabaou N., Lebrihi A., 2006 - Effect of amino acids containing sulfur on dithiopyrrolone antibiotic productions by *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137. Journal of Applied Microbiology, 100, 390-397.
- [20]. Shirling B., Gottlieb D., 1966 - Methods for characterization of *Streptomyces* species. International Journal of Systematic Bacteriology, 16, 3313-3340.
- [21]. Pfefferle, C., Theobald, U., Gürtler, H., Fiedler, H-P., 2000 - Improved secondary metabolite production in the genus *Streptosporangium* by optimization of the fermentation conditions. Journal of Biotechnology, 80: 135-142.
- [22]. Raffaelli D., van der Putten W., Persson L., Wardle D.A., Petchey O., Koricheva J., van der Heijden M., Mikola J., Kennedy T., 2002 - Multi-trophic dynamics and ecosystem processes. In. Biodiversity and Ecosystem Functioning: Synthesis and Perspectives. ed. / M. Loreau; S. Naeem; P. Inchausti. New York : Oxford University Press, 2002. p. 147-154.

- [23]. Zitouni, A., 2004 - Etude taxonomique et des propriétés antagonistes des *Nocardioopsis* et des *Saccharothrix* des sols sahariens et production de nouveaux antibiotiques par *Saccharothrix* sp. 103. Thèse de Doctorat, INP-ENSAT, 230 p.
- [24]. Prescott M.I., Harle J.D., Klein D.A., 2002 - Microbiology of Food. 5<sup>th</sup> ed. McGraw-Hill Ltd, New York, USA. pp. 964-976.
- [25]. Toumatia O., 2010 - Actinomycetes sahariens producteurs d'antifongiques: isolement, taxonomie, caractérisation des antibiotiques et essais de lutte contre les maladies de plantes. Magister de Microbiologie, ENS. de Kouba, Alger, 115 p.
- [26]. Driche E., 2010 - Recherche des *Streptomyces* actifs contre quelques bactéries pathogènes multi-résistantes aux antibiotiques. Mémoire de Magister en microbiologie, ENS de Kouba. 121 p.
- [27]. Strub C., 2008, - Modélisation et optimisation de la production de thiolutine chez *Saccharothrix algeriensis*. Thèse de Doctorat de l'Institut National Polytechnique de Toulouse, France. 203 p.
- [28]. Jonsbu, E., Christensen, B., Nielsen, J., 2001 - Changes of in vivo fluxes through central metabolic pathways during the production of nystatin by *Streptomyces noursei* in batch culture. Appl. Microbiol. Biotechnol., 56, 93-100.