

ETUDE CINÉTIQUE DE LA CROISSANCE DE *Saccharothrix algeriensis* DSM 44581 EN FERMENTEUR BATCH EN PRÉSENCE D'ACIDE BENZOÏQUE ET D'ACIDE HUMIQUE

BOURAS Nouredine^{1,2,3*}, MEKLAT Atika^{2,4}, TOUMATIA Omrane², MOKRANE Salim², BRANDAM Cédric¹, OULD EL HADJ Mohamed Didi⁵, LEBRIHI Ahmed¹, MATHIEU Florence¹ et SABAOU Nasseridine²

⁽¹⁾Université de Toulouse, INPT-ENSAT, Laboratoire de Génie Chimique (LGC), UMR 5503 (CNRS/INPT/UPS), Département de Bioprocédés et Systèmes Microbiens (BioSym), France

⁽²⁾Laboratoire de Biologie des Systèmes Microbiens (LBSM), Ecole Normale Supérieure de Kouba, Alger, Algérie

⁽³⁾Département de Biologie, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de la Terre, Université de Ghardaïa, 47000 Ghardaïa, Algérie

⁽⁴⁾Département de Biologie et Physiologie Cellulaire, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Saâd Dahleb, Blida, Algérie

⁽⁵⁾Laboratoire de protection des écosystèmes en zones arides et semi-arides, Université de Ouargla, 30000 Ouargla, Algérie

E-mail: nouredine_bouras@yahoo.fr

(Received 26 March 2017 - Accepted 02 June 2017)

Résumé. - Le but de ce travail est d'étudier l'effet de l'acide benzoïque et l'acide humique sur la croissance de *Saccharothrix algeriensis* DSM 44581 dans un milieu semi-synthétique en fermenteur batch. Les valeurs de la biomasse maximale sont de 6,54, 8,54 et 7,32 g/l pour le témoin et en présence d'acide benzoïque et d'acide humique, respectivement. Après 48 h de fermentation, la culture témoin subit une lyse cellulaire plus remarquable que celles contenant les acides benzoïque et humique. Une légère acidification du milieu de culture est observée en présence d'acide benzoïque est plus prononcée par rapport aux deux autres cultures (acide humique et témoin). Par ailleurs, il est remarqué une consommation rapide d'O₂ pendant les 24 premières heures de fermentation en présence d'acide benzoïque et dans le milieu témoin. Les quantités d'azote total et minéral diminuent lentement dans toutes les cultures pendant les 80 premières heures de fermentation. La quantité d'azote minéral est nulle à partir de 144 h de fermentation pour le témoin et également en présence d'acide benzoïque. Les résultats obtenus en fermenteurs ne sont pas exactement les mêmes que ceux obtenus en Erlenmeyers d'un point de vue qualitatif et quantitatif.

Mots clés: *Saccharothrix algeriensis*, fermentation, biomasse, acide benzoïque, acide humique.

KINETIC STUDY OF THE GROWTH OF *SACCHAROTHRIX ALGERIENSIS* DSM 44581 IN BATCH FERMENTOR IN THE PRESENCE OF BENZOIC ACID AND HUMIC ACID

Abstract. - This work aimed to investigate the effect of benzoic acid and humic acid on the growth of *Saccharothrix algeriensis* DSM 44581 on semi-synthetic medium by using controlled batch fermentors. The maximum biomass values were 6.54, 8.54 and 7.32 g/l for the control and in the presence of benzoic acid and humic acid, respectively. After 48 hours of fermentation, the control culture showed a noticeable cell lysis than those containing the benzoic and humic acids. A slight acidification of the culture medium was observed in the presence of benzoic acid compared to two other cultures (humic acid and control). On the other hand, we observed a rapid consumption of O₂ during the first 24 hours of fermentation in the presence of benzoic acid and in the control medium. The amounts of total and mineral nitrogen decreased slowly in all cultures during the first 80 hours of fermentation. The amount of mineral nitrogen was zero starting from 144 hours of fermentation for the control and also in the presence of benzoic acid. The growth rate of *S. algeriensis* in all fermentations was fast during the first 10 h of fermentation. The control culture showed a partially cell lysis in comparison to cultures with organic acids. This result showing that

these organic acids could be used for biomass maintaining. The formation of biomass was influenced by the addition of organic acids. The experiment in the fermentor showed some differences with results obtained in Erlenmeyers.

Key words: *Saccharothrix algeriensis, fermentation, biomasse, benzoic acid, humic acid.*

Introduction

Les actinobactéries (anciennement appelées actinomycètes) sont des bactéries Gram positive qui forment des hyphes filamenteux ramifiés. Elles sont définies par un taux élevé (supérieur à 55%) en GC%, ce qui les sépare des autres bactéries ayant un taux inférieur en GC% [1]. Ces microorganismes procaryotes sont généralement aérobies et non mobiles. Ce sont très largement distribués, et ils sont essentiellement des habitants du sol. Ces bactéries mycéliennes dégradent un nombre considérables de composés organiques, et elles sont extrêmement importantes pour la minéralisation de la matière organique dans le sol. Une minorité d'actinobactéries sont phytopathogènes pour les végétaux et pathogènes pour l'humain et les animaux.

La production de nouveaux antibiotiques est actuellement une préoccupation à l'échelle mondiale du fait de la prolifération de souches bactériennes multi-résistantes aux antibiotiques actuellement disponibles. La liste de l'OMS comporte trois catégories principales selon l'urgence du besoin de nouveaux antibiotiques [2].

Le groupe le plus critique comporte des bactéries multi-résistantes qui représentent une menace particulière dans les hôpitaux et les maisons de retraite. Il comporte *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* et diverses *Enterobacteriaceae* (entérobactéries résistance aux carbapénèmes, production de BLSE): dont *Klebsiella*, *Proteus*, *Serratia* et *E. coli*. Ces bactéries sont devenues résistantes à un grand nombre d'antibiotiques (y compris les carbapénèmes et les céphalosporines de troisième génération), les meilleurs produits disponibles pour traiter les bactéries multi-résistantes [2].

Le deuxième groupe de la liste (la catégorie de priorité élevée) comporte d'autres bactéries de plus en plus résistantes. Ce groupe comporte: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Helicobacter pylori*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Salmonella* et *Campylobacter* [2].

Le troisième groupe de la liste (la catégorie de priorité moyenne) comporte *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* et *Shigella* [2].

La biosynthèse des métabolites secondaires, comme les antibiotiques, peut être effectuée sous trois exigences. Premièrement, il est nécessaire d'avoir de la biomasse, c'est-à-dire l'usine cellulaire pour synthétiser les métabolites; deuxièmement, les précurseurs doivent être présents; et troisièmement, les enzymes capables de transformer ces précurseurs, doivent être aussi présentes et actives [3].

La bactérie filamenteuse *Saccharothrix algeriensis* DSM 44581 appartient au groupe des actinobactéries (*Pseudonocardiaceae*). Celle-ci s'est avérée productrice d'antibiotiques

de la classe des dithiopyrrolones (appelées également pyrrothines) et présente des fortes activités antibactériennes, antifongiques et même anticancéreuses [4-8].

Les travaux antérieurs réalisés dans des Erlenmeyers ont montré que la biosynthèse, par *Saccharothrix algeriensis*, des cinq antibiotiques dithiopyrroloniques (la thiolutine, la sénécioyl-pyrrothine, la tigloyl-pyrrothine, l'isobutyryl-pyrrothine et la butanoyl-pyrrothine) est considérablement influencée par la nature et la concentration de différents acides organiques ajoutés dans le milieu de culture [9-11].

Afin d'affiner les résultats dans des conditions mieux contrôlables dans un fermenteur, il est choisi un acide carboxylique aromatique dérivé du benzène: l'acide benzoïque (à 1,25 mM) et un polymère à haut poids moléculaire qui constituent une des fractions les plus importantes de l'humus: l'acide humique (à 1 g/l). Ces deux substances ont été testés pour la croissance de *S. algeriensis* sur le milieu semi synthétique de base (MSS) contenant 0.14 M (25 g/l) de dextrose dans le but de favoriser la biomasse nécessaire pour la synthèse des antibiotiques dithiopyrroloniques.

1. - Matériels et méthode

1.1. - Actinobactérie

Saccharothrix algeriensis DSM 44581 (NRRL B-24137) a été isolée à partir d'un échantillon de sol saharien de la palmeraie d'Adrar (région de Touat). Cette nouvelle espèce bactérienne est productrice de plusieurs antibiotiques de la famille des dithiopyrrolones [4,5].

1.2.- Bioréacteur (fermenteur)

Les cultures sont effectuées dans des fermenteurs de 2,5 l (le volume utile est fixé à 2 l), modèle: New Brunswick Scientific Co., Inc. an Eppendorf Company, Edison, N.J., U.S.A. Les fermenteurs sont inoculés à 5 % volume pré-culture/volume culture (soit 100 ml de pré-culture dans 2 l de culture). Ce fermenteur est équipé d'un ensemble d'agitation pour assurer l'homogénéité du milieu de culture, comprenant un système dont la vitesse d'agitation est réglable par un moteur d'agitation (Magmator Technologies Inc., Fermentor/Bioreactor). Un mode de régulation de la température qui est assuré par un système qui dispose d'un capteur métallique permettant une acquisition très précise. Ce système est relié à une sonde placée dans le milieu de culture ainsi qu'une bande chauffante (New Brunswick, H1, Heat, Ind., MT) autour du fermenteur et une circulation d'eau thermostatée dans un serpentin plongeant dans le bioréacteur. Un dispositif d'aération qui comporte un débitmètre massique à air (Bronkhorst Hi-tec, série F100/200). Un filtre à air stérilisable à l'entrée, un diffuseur d'air situé dans la partie inférieure de la cuve et un condenseur d'eau pour éviter la perte de l'eau par évaporation. Un échantillonneur (une sonde de prélèvement) plongeant dans le milieu de culture. Cette sonde est reliée à l'extérieur à une seringue pour effectuer des prélèvements stériles. Un équipement de septa permettant d'inoculer le fermenteur ou pour diverses alimentations; une sonde pH à immersion stérilisable (Ingold Infit, type 764.50 B/BH), reliée à un ensemble de régulation par un acide (HCl, 2 N) et par une base (KOH, 2 N); une sonde de mesure de pO₂ à pression partielle pour mesurer l'oxygène dissous polarographique (sonde O₂ Ingold, Biolafitte, model 34-10-3003; Mettler Toledo, Zurich, Switzerland) avec leur système de régulation. Le logiciel utilisé est: Bio/Flo[®]/CelliGen[®] 115, Benchtop

Fermentor/Bioreactor, Bio-Command Plus, NBS Bio Command, version 3,3 plus (BioProcessing Software).

1.3. - Milieu de fermentation (pré-culture et culture)

La composition du milieu de culture (de production) a été élaborée par BOURAS *et al.* (2006b, 2000) [12,13]. Ce milieu basal chimiquement défini, dit MSS (Milieu Semi-Synthétique) est composé de (quantité pour 1 l d'eau distillée): D(+) glucose anhydre (dextrose anhydre): 25 g (0,14 M), sulfate d'ammonium: 2 g (15,13 mM), chlorure de sodium: 2 g (34,22 mM), phosphate de mono-potassium: 0,5 g (3,67 mM), phosphate dipotassique: 1 g (5,74 mM), sulfate de magnésium: 0,2 g (0,81 mM), extrait de levure: 2 g, CaCO₃ qui permet de tamponner le pH du milieu de culture: 5 g (3,67 mM). Le pH du milieu de culture est ajusté à 7 avec du NaOH (2N).

Pour les pré-cultures, la préparation des inocula est effectuée en fioles Erlenmeyer de 250 ml contenant 50 ml de MSS. Ces Erlenmeyer sont ensemencés avec un inoculum de spores provenant d'une culture de *S. algeriensis* âgée de 8-10 jours. Le milieu de culture est de la même composition que le milieu basal (MSS).

1.4. - Stérilisation des milieux de culture

Pour les pré-cultures, les Erlenmeyer de 500 ou de 250 ml et contenant respectivement 100 ou 50 ml de milieu (soit 20% de leurs volumes totaux), sont stérilisées dans l'autoclave pendant 20 min à 120°C, alors que le fermenteur de 2,5 l contenant jusqu'à 2 l de milieu de culture est stérilisé pendant 25 min à 120 °C.

Le milieu semi-synthétique (MSS) est stérilisé en deux parties séparées afin d'éviter la réaction de Maillard (entre les sources de carbone et les sources d'azote, c'est-à-dire l'action des sucres sur les protéines) qui peut changer la composition et la couleur du milieu de culture. Le dextrose (solution A) est autoclavé séparément puis mélangé stérilement avec l'autre partie du milieu de culture (solution B contenant les sels et l'extrait de levure) seulement après stérilisation et juste avant l'inoculation.

De même, les produits ajoutés au milieu MSS (l'acide benzoïque et l'acide humique) sont autoclavés séparément et ajoutés au milieu de culture juste avant l'inoculation.

1.5. - Conditions de fermentation (cultures en fermenteur)

Les pré-cultures sont placées dans un incubateur thermostaté à 30°C, et à agitation orbitale fixée à 250 r.p.m (rotation par minute). Toutes les cultures liquides de fermentation discontinue (batch) sont réalisées dans un fermenteur (le volume utile est fixé à 2 l).

L'ensemencement est effectué à partir d'un inoculum en phase exponentielle de croissance (âgé de 36 à 48 h). Après incubation de la pré-culture, une estimation du poids sec permet de fixer le volume de pré-culture nécessaire pour ensemencer le fermenteur de manière à avoir une biomasse initiale d'environ 0,2 g/l (dans le fermenteur). Les conditions opératoires pour les cultures en fermenteur (batch) sont les suivantes: pH est maintenu à une valeur de $7 \pm 0,05$ au début de la fermentation, température d'incubation est maintenue à $30 \pm 0,1$ °C, débit d'air (aération initiale) est fixé à 1 v/v/m (volume d'air par volume de

liquide par minute) soit 2000 ml d'air par minute, pourcentage d'oxygène dissous (pression partielle) est maintenu à $30 \pm 5\%$ de la saturation par modification de la vitesse d'agitation (réglable de 200 à 300 r.p.m). Afin de limiter la formation de mousse, un agent anti-mousse: le Polypropylene P-2000 E ($\text{HO}(\text{C}_3\text{H}_6\text{O})_n\text{C}_3\text{H}_6\text{OH}$), est employé.

Des échantillons sont prélevés, dans des conditions aseptiques, tous les 4 h afin d'établir les cinétiques de fermentation. Un volume de 20 ml, destiné au dosage des substrats, est centrifugé ($10\,000 \times g$ pendant 10 min), puis stocké à $-20\text{ }^\circ\text{C}$ jusqu'à la fin de la fermentation. Le poids sec du mycélium est immédiatement mesuré. La durée d'une fermentation est de 216 h (9 jours).

1.6.- Mesure du poids sec

Elle consiste à peser la biomasse cellulaire contenue dans un volume de culture connu. Pour mesurer le poids sec, il est utilisé la méthode de PFEFFERLE *et al.* (1980) avec quelques modifications [14]. Pour chaque échantillon, 20 ml de culture sont prélevés et mis dans des tubes préalablement disséqués et tarés. Les tubes sont ensuite centrifugés à $16\,000 \times g$ pendant 10 min. Le culot est lavé trois fois par centrifugation en utilisant 1,5 ml de HCl (0,35 M) afin d'éliminer le CaCO_3 , et une dernière fois avec 1,5 ml d'eau distillée.

Par la suite, les cellules sont récupérées par centrifugation. Les tubes sont ensuite placés dans une étuve à $105\text{ }^\circ\text{C}$ pendant 24 heures, puis pesés après refroidissement dans un dessiccateur (gel de silice comme dessiccant, de couleur bleu/rose). Le poids sec ainsi déterminé est ensuite rapporté au litre de volume de culture (exprimé en gramme de matière sèche par litre de milieu de culture). Les pesées sont effectuées sur une balance analytique de précision (Sartorius).

1.7. - Mesure du pH

Lors de la centrifugation pour la mesure du poids sec, le surnageant obtenu est utilisé immédiatement pour enregistrer les variations de pH au cours du temps.

1.8. - Chromatographie en phase liquide à haute performance (CLHP)

Système de Chromatographie en phase Liquide à Haute Performance (CLHP) équipé d'un injecteur automatique de type Thermo Separation Products® Spectra Series Autosampler AS100™, avec une boucle d'injection de 20 μl ; une pompe Spectra System P1000XR (Thermo Separation Products); un détecteur réfractométrique différentiel Spectra Physics Refracto Monitor IV de Thermo Separation Products SP 8430™; une colonne de résine cationique (garnissage résine cationique H^+) Bio rad® Aminex HPX-87H™ de dimension $300 \times 7,8\text{ mm}$ est utilisée à $40\text{ }^\circ\text{C}$, précédée d'une pré-colonne de garde Bio rad (H^+). Un logiciel, Borwin V 1,2 (t-SP V 1.21™, PC A000®) permet de calculer la surface des pics détectés. Ce système CLHP est utilisé pour doser le dextrose et l'acide benzoïque.

1.9. - Dosage du dextrose et d'acide benzoïque par CLHP

Les échantillons prélevés en vue d'une analyse chromatographique ont été centrifugés ($10\,000 \times g$, à $4\text{ }^\circ\text{C}$ et pendant 10 min) et le surnageant est directement congelé à $-20\text{ }^\circ\text{C}$ dans des tubes à essais en verre fermés (les dosages chimiques ont été réalisés après les fermentations). Au moment de l'analyse, l'échantillon a été décongelé à température

ambiante, puis il a été convenablement dilué avec un dilueur automatique. Les concentrations en dextrose, et acide benzoïque ont été analysés par CLHP, après filtration à l'aide d'une seringue et d'un filtre (Minisart Sartorius, 0,2 μm). La phase mobile est une solution d'acide sulfurique (H_2SO_4) à 5.10^{-3} mM (dégazé à l'hélium) élué à un débit isocratique de 0,4 ml/min par une pompe. Le temps d'acquisition est de 40 min.

La courbe d'étalonnage est réalisée avec 5 concentrations pour chaque composé (dextrose et acide benzoïque). Il est utilisé les concentrations suivantes: 0, 2,5, 5, 15 et 25 g/l pour le dextrose et 0, 0,25, 1,25 et 5 mM pour l'acide benzoïque. Les surfaces des pics ont été traitées par ordinateur équipé du logiciel Borwin V 1,2 (t-SP V 1.21TM, PC A000®). Cette surface est corrélée à une valeur en concentration par l'intermédiaire d'une courbe de calibration pour le dextrose et pour l'acide benzoïque. Ainsi, les surnageants des échantillons sont dilués de manière à obtenir des concentrations inférieures ou égales à 25 g/l pour le dextrose et à 4 g/l pour l'acide benzoïque.

1.10. - Dosage du dextrose par la méthode enzymatique YSI

Le dextrose est dosé également par une méthode enzymatique (*Enzymatic Glucose Analyzer*) grâce à un appareil automatique YSI. L'appareil utilise une enzyme immobilisée (glucose-oxydase) sur une membrane, elle-même couplée à une sonde électrochimique. L'enzyme réagit avec le dextrose et produit du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Celui-ci est ensuite électro-chimiquement oxydé par une anode de platine. Cette réaction produit un signal électronique proportionnel à la concentration en dextrose de l'échantillon dosé. La réponse de l'appareil est linéaire entre 0,002 et 25 g/l de dextrose, avec une erreur maximale tolérée de $\pm 5\%$ par rapport à une solution standard à 25 g/l de dextrose.

1.11. - Dosage de l'azote ammoniacal

L'azote ammoniacal (concentration d'ammonium: NH_4^+) est dosé par une méthode enzymatique proposée en kit par Boehringer-Mannheim (kit Diagnostics Ammonia, Enzymatic BioAnalysis/Food Analysis, UV-test, approx. 50 assays). Référence: R-Biopharm, K-Amia, AG, D-64293, E 1112732, Darmstadt Roche).

En présence de la glutamate déshydrogénase (GIDH) et du dinucléotide nicotinamide-adénine réduit (NADH), l'ammoniaque réagit avec 2-oxoglutarate pour donner le L-glutamate. Le NADH s'oxyde en NAD^+ .



La quantité de NADH oxydée dans la réaction ci-dessus est stoechiométrique à la quantité d'ammoniaque. La quantité de NADH est déterminée grâce à son absorbance à 334, à 340 ou à 365 nm.

L'appareil utilisé est le Mascot Plus, qui est composé de trois parties: le distributeur sur lequel sont placés les réactifs et les échantillons et qui assure la partie préparation (prélèvement des réactifs, des échantillons, pré dilutions, post-dilutions); le banc optique où sont transférés les prélèvements et où est assuré le suivi des réactifs et l'interface utilisateur par l'intermédiaire de laquelle sont programmés les paramètres de fonctionnement de l'analyseur.

Le consommable est le suivant: échantillons à une dilution adaptée et la solution standard d'ammoniac à concentration connue pour test, solution de mouillant, cuves PMMA (540 barrettes de 8 cuves), cuves polystyrènes (540 barrettes de 8 cuves), godets de 0,5 ml (1000), godets pour antisérum (25) et flacons réactifs complets (16) et essuyeurs (32). Le réactif R₁ est composé de 1 ml de 2-oxoglutarate, 1 ml d'eau déionisée et 1 tablette du flacon 2 (flacon contenant des tablettes de NADH). Le réactif R₂ est composé de 0,1 ml de GIDH et 0,9 ml d'eau déionisée.

Au cours du dosage et aussitôt qu'une analyse est terminée, le résultat s'affiche sur la partie droite de l'écran du synoptique de travail. Le numéro de la cuve de mesure utilisée, le numéro du godet et le nom du paramètre traité sont suivis du résultat calculé. L'équation générale pour calculer la concentration est la suivante:

$$C = \frac{V \times MW}{\varepsilon \times d \times v \times 1000} \times \Delta A \quad (g / l)$$

V = volume finale [ml],

v = volume de l'échantillon (ml),

MW = poids moléculaire de la substance à tester (g/mol),

d = trajet de la lumière (cm),

ε = coefficient d'extinction de NADH: 6,3 ($1 \times \text{mmol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$) à 340 nm; 6,18 ($1 \times \text{mmol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$) à 334 nm et 3,4 ($1 \times \text{mmol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$) à 365 nm.

Pour l'ammonium, on a:

$$C = \frac{3,020 \times 17,03}{\varepsilon \times 1,00 \times 0,100 \times 1000} \times \Delta A = \frac{0,514}{\varepsilon} \times \Delta A_{[g \text{ ammoniac} / l \text{ échantillon}]}$$

Si l'échantillon a été dilué sur la préparation, le résultat doit être multiplié par le facteur F de dilution. En analysant les échantillons solides et semi solides qui sont pesés pour la préparation témoin, le résultat doit être calculé à partir de la quantité pesée.

Pour l'azote ammoniacal:

$$\text{content ammonia} = \frac{C_{\text{ammonia}} (g / l \text{ sample})}{\text{weight sample} (g / l)} \times 100 (g / 100 g)$$

1.12. - Dosage de l'azote total

L'azote total est dosé par une méthode proposée en kit par Odyssey / Fisher (kit Odyssey DR / 2500, Test N Tube™ Vials, LR (10-150 mg/l N). Référence: kit 26722-45. La méthode utilisée pour est la digestion par le persulfate. Le réacteur de type COD, *Analyzer and COD heating Reactor*, Hach. Company, USA. Spectrophotomètre (Spectro-Hach Odyssey), USA. Le réactif 1 est composé de 0,5 ml de l'échantillon (à une dilution adaptée) + le réactif (*Hydroxyde Reagent* composé d'hydroxyde de sodium) + un sachet de persulfate de potassium (K₂S₂O₈). Chauffer le réactif 1 pendant 30 minutes dans un réacteur COD, Hach (à une température de 105 °C), puis laisser refroidir à la température ambiante, et ajouter au réactif 1, un sachet de réactif A (métabisulfite de sodium = pyrosulfite de sodium : Na₂O₅S₂) et mélanger pendant 2 minutes, par la suite ajouter au réactif 1, un sachet de réactif B (acide chromatopique, sel disodium, quartz blanc, urée et métabisulfite de sodium) et mélanger pendant 5 minutes. Un blanc est préparé dans les mêmes conditions, avec 0,5 ml d'eau déionisée présente dans le kit. Mettre 2 ml de réactif

1 dans le réactif C (acide sulfurique) et mélanger pendant 5 minutes. Effectuer la lecture à 410 nm dans un spectrophotomètre spectro-Hach, Touch (Hach Programs), Select Program (350N, Total TNT/ n° 395). Les résultats sont exprimés en mg d'azote total/l.

2. - Résultats

2.1.- Effet sur la croissance de *S. algeriensis*

Il est effectué des fermentations en présence d'acide benzoïque et d'acide humique pour une durée de fermentation de 216 heures.

Il est remarqué dans cette série de fermentation que la croissance est très rapide pendant les dix premières heures (fig. 1). Les valeurs de la biomasse maximale sont de 6,54, 8,54 et 7,32 g/l pour le témoin et en présence d'acide benzoïque et d'acide humique, respectivement. Après 48 h de fermentation, la culture témoin subit une lyse cellulaire (phase de déclin) plus remarquable que celles contenant les acides benzoïque et humique.

Les valeurs obtenues de μ_{max} sont de $0,27\text{ h}^{-1}$ pour le témoin et de $0,30\text{ h}^{-1}$ en présence d'acide benzoïque et d'acide humique. Ces valeurs ont été obtenues après 13 h de fermentation chez le témoin et en présence d'acide humique et uniquement après à 25 h en présence d'acide benzoïque. Les résultats montrent qu'il n'y a pas une différence significative de la croissance de *S. algeriensis* en présence de ces différentes substances.

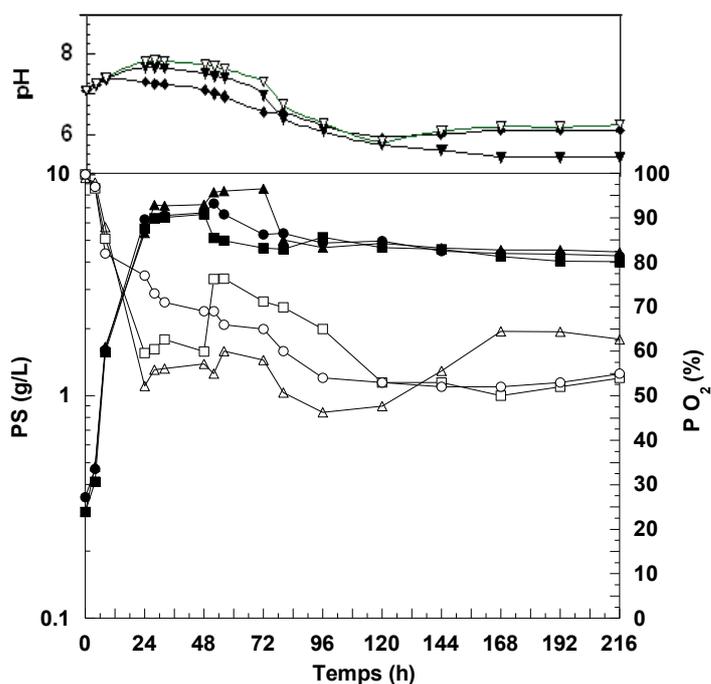


Figure 1.- Cinétique de la variation de la biomasse (▲, ●, ■), P(O₂) (Δ, ○, □) et du pH (▼, ▽, ◆), dans différentes cultures de 2 l, en fermenteur, en présence d'acide benzoïque (1,25 mM), d'acide humique (1 g/l), et dans le milieu témoin, respectivement.

2.2.- Effet sur le pH et le P(O₂)

Lors des fermentations en présence d'acide benzoïque, d'acide humique et dans le milieu témoin, les valeurs du pH ne sont pas significativement affectées pendant les 80 premières heures de fermentation (fig. 1). En revanche, une légère acidification du milieu de culture est observée après cette période de fermentation. L'acidité observée en présence

d'acide benzoïque est plus prononcée par rapport aux deux autres cultures (acide humique et témoin). Par ailleurs, il est remarqué une consommation rapide d'O₂ pendant les 24 premières heures de fermentation en présence d'acide benzoïque et dans le milieu témoin. Cette période coïncide avec la phase exponentielle de croissance de l'actinobactérie. En revanche, la chute du taux de l'oxygène dans le milieu de culture est moins prononcée en présence d'acide humique. De plus, chez le témoin en particulier, il est remarqué une légère augmentation de la PO₂. Elle serait due à une lyse cellulaire partielle.

2.3.- Effet sur la consommation des substrats

Il est remarqué que les quantités d'azote total et minéral diminuent lentement dans toutes les cultures en présence d'acide benzoïque, d'acide humique et dans le milieu témoin pendant les 80 premières heures de fermentation. La quantité d'azote minéral est nulle à partir de 144 h de fermentation pour le témoin et également en présence d'acide benzoïque (fig. 2).

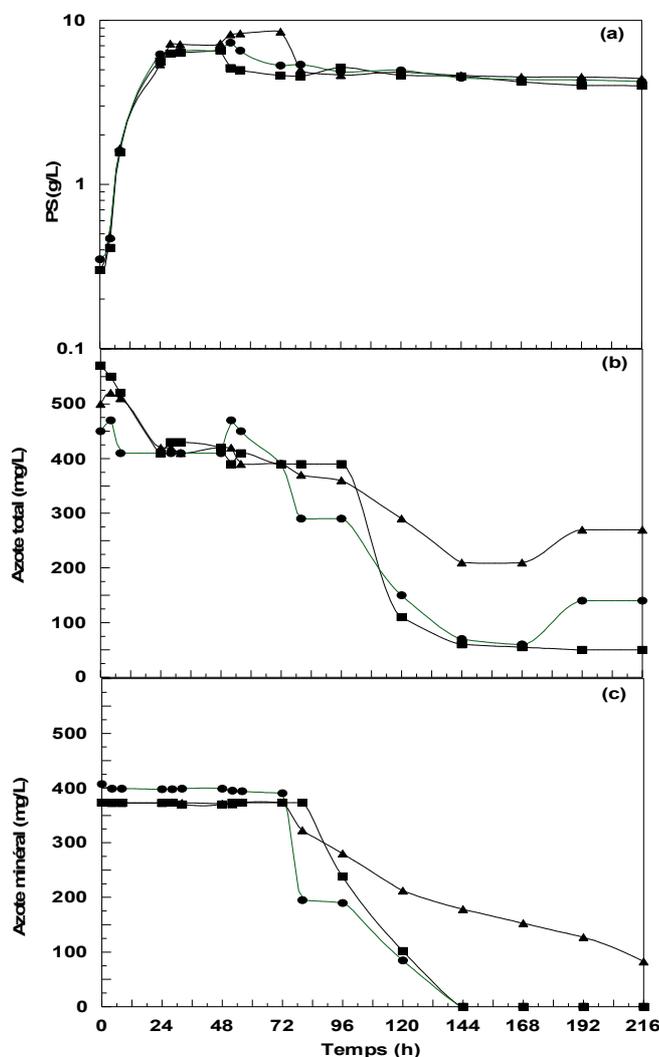


Figure 2.- Cinétique de la variation de la biomasse (a) (▲, ●, ■), de l'azote total (b) (▲, ●, ■) et de l'azote minéral (c) (▲, ●, ■), dans différentes cultures en batch, dans des fermenteurs de 2 l, en présence d'acide benzoïque (1,25 mM), d'acide humique (1 g/l), et dans le témoin, respectivement

L'acide benzoïque n'a pas été détecté par la méthode CLHP et la colonne utilisées. L'éventuelle production des acides organiques à courte chaîne comme le propionate, l'acétate et le butyrate a été également recherchée. Aucun de ces acides n'a été détecté.

L'assimilation du g dextrose a été vérifiée. Les résultats montrent qu'après 72 à 80 h de fermentation en présence d'acide benzoïque, d'acide humique et dans le milieu témoin, que la consommation de dextrose est très réduite, bien que les valeurs de biomasse soient de l'ordre de 6,54 à 8,54 g/l. Une légère consommation de dextrose est observée après 96 h de fermentation. Les concentrations de dextrose après 216 h de fermentation sont de 17,1, de 9,12 et de 8 g/l en présence d'acide benzoïque, d'acide humique et dans le milieu témoin, respectivement.

Au vu des résultats il n'y a pas ou peu de consommation de dextrose dans le milieu de culture, malgré l'enregistrement des valeurs de biomasse de l'ordre de 5,97 à 8,90 g/l entre 32 et 52 h. Afin de vérifier les résultats obtenus par CLHP, il est quantifié le dextrose par une autre méthode enzymatique (l'YSI). Les résultats acquis par cette méthode confirment ceux obtenus par CLHP.

3. - Discussion

La formation de la biomasse est soumise à la régulation par des mécanismes dus au métabolisme des sources de carbone, d'azote et de phosphate: induction et répression de la biosynthèse, rétro-inhibition et inactivation enzymatique [15].

Malgré des conditions de préculture standardisées, des différences de valeurs de biomasse et de vitesses de croissance ont été observées. Ces différences pourraient être dues à la variabilité de l'état physiologique de l'inoculum lié à la préparation des précultures et à la particularité de différenciation de certains genres bactériens comme le genre *Saccharothrix*. Lors d'une culture de microorganisme, le fermenteur représente un lieu de transformations biochimiques, énergétiques et rhéologiques très complexes.

L'assimilation de certains acides organiques (gras ou non) ajoutés dans le milieu de fermentation, modifie significativement la formation des cellules (biomasse). Il a été prouvé que l'ajout d'un acide organique (méthyl-oléique) modifie la composition lipidique de la membrane cytoplasmique chez *Streptomyces hygroscopicus* [16]. Il est possible que le benzoate entraîne une modification de la composition de la membrane plasmique et évite la lyse cellulaire (déclin).

Les résultats, concernant les valeurs obtenues de la biomasse, montrent que les éléments nutritifs de l'extrait de levure peuvent jouer un rôle primordial dans la formation de la biomasse chez *Saccharothrix algeriensis*.

References

- [1].- Holt J. G., Krieg N. R., Sneath P. H. A., Staley J. T., Williams S. T., 1994.- Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Williams et Wilkins, Baltimore, USA, 754 p.

- [2].- Sophie M., 2012.- Evolution des resistances bacteriennes et relation avec la consommation d'antibiotiques. Doctorat en pharmacie, Université de Lille 2, Lille, 207 p.
- [3].- Voelker F., Altaba S., 2001.- Nitrogen source governs the patterns of growth and pristinamycin production in *Streptomyces pristinaespiralis*. *Microbiology*, 147: 2447–2459.
- [4].- Lamari L., Zitouni A., Boudjella H., Badji B., Sabaou N., Lebrihi A., Lefebvre G., Seguin E., Tillequin F., 2002.- New dithiopyrrolone antibiotics from *Saccharothrix* sp. SA 233. I. Taxonomy, production, isolation and biological properties. *Journal of Antibiotics*, 55: 696–701.
- [5].- Lamari L., Zitouni A., Dob T., Sabaou N., Lebrihi A., Germain P., Seguin E., Tillequin F., 2002.- New dithiopyrrolone antibiotics from *Saccharothrix* sp. SA 233. II. Physicochemical properties and structure elucidation. *Journal of Antibiotics*, 55: 702–707.
- [6].- Minamiguchi K., Kumagai H., Maduda T., Kawada M., Ishizuka M., Takeuchi T., 2001.- Thiolutin, an inhibitor of huvec adhesion to vitronectin, reduces paxillin in huvecs and suppresses tumor cell-induced angiogenesis. *International Journal of Cancer*, 93: 307–316.
- [7].- Oliva B., O'Neill A., Wilson J. M., O'hanlon P. J., Chopra I., 2001.- Antimicrobial properties and mode of action of the pyrrothine holomycin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45: 532–539.
- [8].- Webster J. M., Li J., Chen G. 2000.- Anticancer property of dithiopyrrolones. U.S. Patent 6020360, 1-4.
- [9].- Bouras N., 2005.- Régulation de la production d'antibiotiques dithiopyrrolones chez *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137. Thèse (Ph.D), Institut National Polytechnique, ENSAT-INP, Toulouse, 238 p.
- [10].- Bouras N., Mathieu F., Sabaou N., Lebrihi A., 2007.- Influence on dithiopyrrolone antibiotic production by organic acids in *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137. *Process Biochemistry*, 42: 925–935.
- [11].- Bouras N., Merrouche R, Lamari L, Mathieu F., Sabaou N., Lebrihi A., 2008.- Precursor-directed biosynthesis of new dithiopyrrolone analogs by *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137. *Process Biochemistry*, 43: 1244–1252.
- [12].- Bouras N., Mathieu F., Sabaou N., Lebrihi A., 2006a.- Effect of amino acids containing sulfur on dithiopyrrolone antibiotic productions by *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137. *Journal of Applied Microbiology*, 100: 390–397.
- [13].- Bouras N., Mathieu F., Sabaou N., Lebrihi A., 2006b.- Nutritional requirements for the production of dithiopyrrolone antibiotics by *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137. *Enzyme and Microbial Technology*, 100: 1423–1429.

- [14].- 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.
- [15].- Martín J. F., Demain A. L., 1980.- Control of antibiotic biosynthesis. *Microbiological Reviews*, 44: 230–251.
- [16].- David L., Loutheiller H., Bauchart O., Auboiron S., Asselineau J. 1992.- Effects of exogenous methyl oleate on the biosynthesis of nigericin, a polyether carboxylic antibiotic, by *Streptomyces hygroscopicus* NRRL B-1865. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 56: 330–339.