

## ISOLEMENT D'ACTINOMYCETALES PRODUCTRICES DE SUBSTANCES ANTIMICROBIENNES A PARTIR DE LA SEBKHA DE AIN MLILA

Reçu le 10/04/2004 – Accepté le 19/03/2005

### Résumé

L'évolution constante de la résistance bactérienne aux antibiotiques et l'émergence de nouvelles maladies infectieuses justifient l'urgence de disposer de nouvelles molécules antimicrobiennes. Des échantillons d'eau et de sol environnant de Sebkhah ont été explorés dans le cadre de la recherche de souches actinomycétales productrices, éventuellement, de nouveaux antibiotiques. Sur les quatre milieux d'isolement utilisés, quarante deux types de colonies bactériennes se rapprochant par leur aspect macroscopique aux actinomycètes ont été prélevées. L'observation microscopique à l'état frais et après coloration de Gram a révélé que parmi les quarante deux colonies trente-neuf sont à coloration de Gram positive dont cinq souches seulement présentent un aspect filamenteux, quelque fois fragmenté ; ce qui les rapprochent d'une manière certaine aux actinomycètes filamenteux. Après purification, l'activité antibactérienne des cinq souches actinomycétales a été mise en évidence sur deux milieux de composition différente et par deux techniques de diffusion sur gélose : technique de la double couche et technique des cylindres d'agar. Toutes les souches ont présenté une activité inhibitrice à l'égard des souches bactériennes-tests de collection à coloration de Gram positive et/ou à coloration de Gram négative et ceci quelle que soit la technique utilisée. Trois souches d'entre elles ont montré une activité vis à vis d'*Aspergillus niger*, d'*Aspergillus oryzae* et de *Candida albicans*. L'analyse statistique a révélée que la mise en évidence de l'activité antibactérienne et de l'activité antifongique dépendent, à la fois, des souches actinomycétales étudiées, de la composition des milieux de culture et des microorganismes-tests utilisés.

**Mots clés :** Actinomycètes, Antibiotiques, Sebkhah, Isolement, Technique.

### Abstract

The constant development of bacterial resistance to antibiotics and the appearance of new infection diseases justify the emergency of searching new antibiotics. In this context, extreme habitats (salt pans) were investigated to search antibiotics-producers actinomycetes on four selective mediums. Thirty-nine among the forty-two bacterial colonies isolated from salt pans's water and soil were Gram positive bacteria and five of them showed a filamentous structure: principal characteristic of active actinomycetes. The antibacterial activities of the five actinomycete's isolates were tested on two production media using two different techniques (double layer technique and agar cylinder technique). All strains showed an antibacterial activity against Gram positive and/or Gram negative bacteria and three of them were active against fungi. The statistical analysis revealed that the apparition of all these activities depends on producer strain, composition of the culture media and used test-microorganism.

**Key words:** Actinomycetes, Antibiotics, Salt pans, Isolation, Technique.

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

Laboratoire de Génie Microbiologique et Applications Département des Sciences de la Nature Faculté des Sciences Université Mentouri-Constantine Route d'Ain-el-Bev 25000 Constantine.

### ملخص

نتيجة للانتشار الكبير للمقاومة البكتيرية للمضادات الحيوية و ظهور أمراض معدية جديدة، أصبح من الضروري البحث عن جزيئات جديدة ذات نشاط مضاد للميكروبات. لهذا الهدف، تم استغلال عينات من ماء السبخة والأرض المجاورة لها لعزل الأكتينوميستات المنتجة للمضادات الحيوية باعتبارها أوساط ذات ظروف بيئية قسوى لتتأثر أو يربعون مستمرة بكتيرية تم عزلها باستعمال أريعة أوساط زرع مختلفة. الملاحظة المجهرية لهذه المستعمرات في الحالة الحية و بعد صبغ القرام أظهر أنها تضم تسعة و ثلاثون عزلة موجبة القرام منها خمسة فقط ذات بنية خيطية و هي الميزة الأساسية للأكتينوميستات الأكثر إنتاجا للمضادات الحيوية. تم الكشف عن النشاط المضاد للبكتيريا للعزلات الخمسة بعد تنقيتها و ذلك باستعمال وسطي زرع مختلفين و تقنيتي الانتشار داخل أوساط الزرع الصلبة (تقنية الطبقة المضاعفة و تقنية أسطوانات الأجار). كل العزلات أظهرت نشاط مضاد للبكتيريا موجبة القرام و/ أو سالبة القرام مهما كانت التقنية المستعملة و ثلاثة منها أظهرت نشاط مضاد للفطريات. الدراسة الأحصائية أكدت أن اظهار كل هذه النشاطات وشدتها مرتبط بطبيعة عزلة الأكتينوميستات المنتجة لهذه المواد و مكونات وسط الزرع وكذا الكائن المجهرية التجريبية المستعمل.

**الكلمات المفتاحية :** الأكتينوميستات، المضادات الحيوية، السبخة، العزل، التقنية.

Depuis l'avènement des antibiotiques, une nette amélioration de la qualité et de la durée de vie a été constatée. Cependant leur utilisation intensive a eu pour conséquence l'adaptation des bactéries à ces remarquables substances. En effet, ces dernières années ont été marquées par une augmentation inquiétante de la multirésistance de bactéries pathogènes, la résurgence de maladies infectieuses que l'on croyait parfaitement maîtrisées et l'émergence de nouveaux pathogènes et ceci particulièrement dans les pays en voie de développement [1]. Ces constats expliquent l'urgence de disposer de nouvelles molécules antibiotiques. Les actinomycètes, bactéries à Gram positif à majorité filamenteuses, représentent la principale source naturelle de métabolites anticellulaires [2]. Environ 75% des antibiotiques découverts entre 1971 et 1980 appartiennent aux actinomycètes [3]. L'isolement d'Actinomycétales actives à partir d'écosystèmes non ou peu exploités permet, éventuellement, la découverte de souches rares ou de souches pouvant avoir un potentiel de production élevé ou inexploité.

A ce titre, nous avons cherché à isoler des Actinomycétales productrices de métabolites antimicrobiens à partir de «Sebkhah» (ou «salt pans») comme les nomment les Anglo-saxons) en vue de la caractérisation et l'utilisation de ces molécules. Ces lacs très salés, peu profonds (quelques mètres) et temporaires constituent des régions rares dans le monde qui peuvent s'assécher plus ou moins complètement à la suite d'une absence prolongée d'averses devenant alors des surfaces de sel.



## MATERIEL ET METHODES

### Prélèvements des échantillons

Les prélèvements ont été réalisés à partir de trois sites différents de la Sebkhia de Ain Mlila Sebkhia située dans le nord-est de l'Algérie (006° 34'E, 036°02'N) durant le mois de février, dans des conditions d'aseptie rigoureuse. Six échantillons (250 ml par échantillon) d'eau sont prélevés à partir de deux tables carrées différentes de la Sebkhia (15m x 15 m) à raison de trois échantillons par table et sont récupérés dans des flacons en verre stériles.

Pour le prélèvement de sol, une quantité de 100g de terre est prélevée jusqu'à 10 cm de profondeur après avoir écarté les trois premiers centimètres de sol, puis déposée à l'aide d'une spatule stérile sur une feuille d'aluminium stérile, après un premier tri écartant les pierres, l'échantillon (50g) est récupéré dans un flacon stérile. Ce dernier prélèvement a été effectué à partir du sol environnant la Sebkhia dépourvue de végétation. L'acidité des différents échantillons est mesurée dès l'arrivée au laboratoire selon la méthode de **Pochon (1964)** [4].

### Milieu de dilution

2g d'échantillon de sol sont dilués dans 18 ml d'eau physiologique stérile puis agités au vortex deux fois pendant 5 mn. Pour cette suspension et les échantillons d'eau, des séries de dilutions décimales (de  $10^{-1}$  à  $10^{-5}$ ) sont effectuées.

### Milieux d'isolement

Quatre milieux différents additionnés d'amphotéricine B (antifongique) à une concentration de 50µg/ml et d'acide nalidixique (antibactérien inhibant les bactéries à coloration de Gram négative) à une concentration de 10µg/ml, sont retenus, les trois premiers milieux sont sélectifs pour actinomycètes: le milieu M1 qui est formé à partir d'eau de Sebkhia, le milieu M2 qui est un milieu très riche (sources de carbone et d'azote, sels minéraux et oligaux éléments) et le milieu M3 qui contient l'extrait de levure comme seule source de carbone et d'azote. Le quatrième milieu M4 est utilisé à la fois pour toutes les bactéries et les mycètes. Dans ce cas, l'antibactérien et l'antifongique sont les seuls composés qui vont sélectionner les actinomycètes.

Tous les milieux sont additionnés de 0,5% NaCl à l'exception du milieu M1, pour s'approcher de la salinité de la Sebkhia sans se mettre dans des conditions halophiles [6]. Chaque milieu est Pour les quatre milieux, le pH est ajusté, avant stérilisation, à 7,3. Les compositions des différents milieux sont :

**Milieu M1** : Agar (18 g/l), amidon (10g/l), extrait de levure (4g/l), peptone (2g/l).

**Milieu M2** : Agar (18 g/l), amidon (10 g/l), KNO<sub>3</sub> (2 g/l), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (2 g/l), NaCl (2 g/l), caséine (0,3 g/l), MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (0,05g/l), CaCo<sub>3</sub> (0,02g/l), FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (0,01 g/l).

**Milieu M3** : Agar (18 g/l), extrait de levure (0,25 g/l), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0,5 g/l).

**Milieu M4**: Agar (18g/l), extrait de levure (3g/l), extrait de

malt (3g/l), peptone (5g/l), glucose (10g/l).

Les quatre milieux sont ensemencés à raison de 0,1ml par dilution ( $10^0$  à  $10^{-5}$ ) par boîte de pétri (trois boîtes pour chaque dilution). Les boîtes sont incubées à 30°C et sont observées quotidiennement après une semaine jusqu'à un mois d'incubation. Des boîtes de chaque milieu sont incubées, sans ensemencement, comme témoins de stérilité des milieux de culture.

### Aspect microscopique et purification

Toutes les colonies se rapprochant par leur aspect macroscopique aux actinomycètes sont observées au microscope (Grossissement x 100) à l'état frais et après coloration de Gram. Celles appartenant aux actinomycètes sont repiquées, par la méthode des stries, sur les mêmes milieux que ceux d'isolement. Cette dernière opération est répétée jusqu'à obtention de souches pures.

### Conservation de souches Actinomycétales isolées

Les colonies d'actinomycètes isolées et purifiées sont ensemencées sur milieu M2 + 0,5% NaCl, exempt d'antibiotiques et sont incubées à 30°C pendant deux semaines puis conservées à 4°C, le repiquage est réalisé tous les deux mois. Pour les conserver plus longtemps, des cultures de deux semaines d'actinomycètes en milieu liquide sont additionnées de glycérol stérile d'une concentration de 15% (V/V) et sont immédiatement congelées.

### Mise en évidence des activités antibactériennes des souches actinomycétales

Quatre souches bactériennes sensibles, de collection, sont utilisées pour ce test : *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) et *Bacillus cereus* (souche récupérée auprès du CHU de Constantine). La recherche des métabolites antibactériens a été effectuée par deux techniques :

- **La première** est voisine de celle utilisée par Peterson (1954), les souches d'actinomycètes sont ensemencées en touches à la surface des boîtes de pétri contenant les milieux GBA [5] et ISP-2 + 0,5%NaCl [6] puis les boîtes sont incubées 14 jours à 28°C, la culture est ensuite recouverte par le milieu Mueller-Hinton faiblement gélosé ensemencé en masse avec une souche-test. Les boîtes sont observées après 24 heures d'incubation à 37°C. Les zones d'inhibition sont mesurées en millimètres du bord de la colonie d'actinomycètes à la limite de la zone où la bactérie-cible n'est pas inhibée.
- **La deuxième** technique est celle des cylindres d'agar [7] qui consiste à prélever des cylindres de 6mm de diamètre de cultures d'actinomycètes de 14 jours et de les déposer sur milieu Muller-Hinton gélosé ensemencé en surface avec une bactérie-test. Les zones d'inhibition sont mesurées après 24 heures d'incubation à 37°C.

### Mise en évidence des activités antifongiques

La production de métabolites antifongiques par les



souches actinomycétales est mise en évidence par la technique des cylindres d'Agar en utilisant le milieu Sabouraud à la place du milieu Muller- Hinton. Les champignons-tests utilisés sont les suivants : *Candida albicans* (Institut Pasteur), *Aspergillus niger* (ATCC 16404) et *Aspergillus oryzae* (Ahlburg cohen 1042.72). L'incubation se fait à 37°C pour les boîtes de *candida albicans* et à 28°C pour celles des champignons filamenteux.

**Tableau 1 :** Criblage initial de souches d'actinomycètes.

Echantillon		Eau (E1)	Eau (E2)	Sol(S)	
pH		6,26	7,85	6,72	
Nombre de colonies apparues sur milieu	M1	actinomycètes	0	0	0
		Non actinomycètes	4	5	6
	M2+0,5%NaCl	actinomycètes	3	0	0
		Non actinomycètes	1	3	1
	M3+0,5NaCl	actinomycètes	1	0	0
		Non actinomycètes	5	1	1
	M4+0,5%NaCl	actinomycètes	0	0	1
		Non actinomycètes	2	4	4

### Présentation des résultats

Dans les deux cas (activité antibactérienne et antifongique), les zones d'inhibition inférieures à 10 mm sont représentées par le signe (+), celles supérieures ou égales à 10mm sont représentées par le signe (++)

### Analyse statistique

La méthode de l'analyse de la variance (méthode de Fischer-Snedecor) à trois facteurs est employée pour l'évaluation de l'effet du milieu de culture, des souches d'actinomycètes productrices, et des microorganismes-tests sur l'apparition des activités antimicrobiennes. Cette analyse est réalisée par le logiciel Statistica (version 5.1 (1998)).

## RESULTATS ET DISCUSSION

### Isolement des actinomycètes

Sur l'ensemble des milieux sélectifs utilisés, quarante deux types de colonies bactériennes se rapprochant par leur aspect macroscopique aux actinomycètes, ont été prélevées. L'observation microscopique, à l'état frais et après coloration de Gram, a révélé que parmi les quarante deux colonies trente-neuf sont à coloration de Gram positive. Cinq souches seulement présentent un aspect filamenteux, quelque fois fragmenté, ce qui les rapproche d'une manière certaine aux actinomycètes filamenteux.

Parmi les quatre milieux sélectifs utilisés, le milieu M2 + 0,5% NaCl additionné d'antibiotiques s'est montré efficace en permettant une bonne récupération des actinomycètes à partir des milieux naturels en comparaison avec les trois autres milieux utilisés (Tableau 1).

Cette performance s'expliquerait par la présence, dans ce milieu, d'amidon et de caséine, qui stimulent la

croissance des actinomycètes préférentiellement aux autres bactéries, favorisant ainsi leur récupération à partir des milieux naturels [8]. Les milieux M4 + 0,5%NaCl et M3 + 0,5%NaCl ont permis d'isoler, chacun une souche d'actinomycète : le premier milieu, devenu sélectif des actinomycètes après addition d'antibactérien et d'antifongique, renferme de l'amidon, très utilisé par les actinomycètes et le deuxième est un milieu à faible concentration en nutriments organiques, ce type de milieu retarde la croissance des bactéries non filamenteuses (à croissance rapide) pendant une période suffisante à l'apparition des colonies d'actinomycètes [9]. Les résultats

négatifs obtenus avec le milieu M1 peuvent être expliqués soit par des interactions entre les ingrédients du milieu de culture

et les constituants de l'eau de Sebkhia, défavorisant ainsi la croissance des actinomycètes ou par l'absence d'actinomycètes halophiles dans les échantillons prélevés, ce qui suppose que les cinq souches d'actinomycètes isolées existaient dans la Sebkhia sous forme sporulée. Cependant, l'efficacité des milieux semi-synthétiques a été prouvée par plusieurs travaux d'isolement d'actinomycètes à partir d'environnements marins [10, 11].

Les cinq souches d'actinomycètes isolées présentent différents aspects macroscopiques sur milieu M2+0,5%NaCl mais sont toutes dures et enfoncées dans la gélose (Tableau 2)

Enfin, il est important de signaler que les prélèvements ont été réalisés durant la saison pluvieuse ce qui explique le faible nombre d'actinomycètes isolés. Jiang et Xu (1996) [12] ont démontré que les actinomycètes sont, généralement, plus abondants durant les saisons sèches que les saisons pluvieuses. En plus, quatre souches actinomycètes sur cinq ont été isolées à partir de l'échantillon E1 dont le pH est faiblement acide comparativement aux autres échantillons, ce qui est en accord avec les résultats de Goodfellows et Williams (1983) [13] qui ont trouvé que les actinomycètes sont plus abondants dans les milieux faiblement acides.

### Mise en évidence des activités antimicrobiennes

Les résultats, réunis dans les Tableaux 3 et 4, montrent que toutes les souches actinomycètes isolées présentent une activité antibactérienne et trois d'entre elles possèdent une activité antifongique. Cependant, l'apparition et les valeurs des zones d'inhibition diffèrent d'un milieu de culture à un autre et varient, sur le même milieu de culture, d'une bactérie-test à une autre.

### Analyse de la variance (ANOVA)

Les facteurs «souche productrice» et «microorganisme-test» et toutes les interactions se sont montrés hautement significatifs sur l'apparition des activités antibactériennes et antifongiques chez l'ensemble des souches d'actinomycètes (Tableau 5). L'effet du facteur «milieu» qui n'est pas statistiquement significatif sur l'activité antibactérienne des actinomycètes, apparaît dans les interactions («milieu/souche productrice» et «milieu/ microorganisme-test») et surtout dans l'interaction «milieu/souche



productrice/ microorganisme-test». Ces constats reflètent la variation des activités des souches d'actinomycètes d'un milieu de culture à un autre et d'une bactérie-test à une autre. Les variations de zones de lyse sont dues au fait qu'une souche d'actinomycète peut produire plusieurs molécules antimicrobiennes (différents spectres d'action) dont la nature dépend de la composition du milieu de culture [14]. Ainsi, le choix des milieux de culture et des microorganismes-tests est d'une importance capitale pour mettre en évidence les activités antimicrobiennes des actinomycètes.

**Tableau 2 :** Description des colonies d'actinomycètes isolées, cultivées sur milieu M2+0,5% Na Cl pendant 14 jours.

Milieu d'isolement	actinomycètes isolés
M2 + 0,5%NaCl	<p><b>Souche A2 (E1) :</b> Circulaire de 5mm de diamètre à périphérie échancrée, ombiliquée. Surface grise, opaque et poudreuse. Incrustante dans la gélose.</p> <p><b>Souche A5 (E1) :</b> Circulaire de 3mm de diamètre à périphérie entière, élevée. Surface marron clair, opaque et poudreuse. Incrustante dans la gélose.</p> <p><b>Souche A1 (E1) :</b> Circulaire de 5mm de diamètre à périphérie échancrée, ombiliquée. Surface rose clair, opaque et poudreuse. Incrustante dans la gélose.</p>
M3 + 0,5%NaCl	<p><b>Souche A4 (E1) :</b> Circulaire de 5mm de diamètre à périphérie entière, convexe. Surface jaune brun, opaque et non poudreuse. Incrustante dans la gélose. Présence d'un pigment jaune brun diffusible dans la gélose.</p>
M4 + 0,5%NaCl	<p><b>Souche A3 (S) :</b> Colonies punctiformes, à périphérie entière, élevée, surface blanche, opaque et poudreuse.</p>

## DISCUSSION GENERALE ET CONCLUSION

L'une des stratégies suivies dans la recherche de nouvelles molécules antibiotiques consiste à explorer des écosystèmes peu ou pas étudiés, essentiellement, les écosystèmes dont l'un ou plusieurs facteurs environnementaux sont extrêmes (salinité, pH, etc.) [15, 16, 17, 18]. Les Sebkhass (lacs très salés) qui constituent des régions rares dans le monde semblent être des environnements promoteurs pour isoler des actinomycètes sources de nouvelles molécules antibiotiques [19, 20]. Ainsi, cinq souches d'actinomycètes ont été isolées à partir d'eau de Sebkhass et de sol environnant en utilisant quatre milieux sélectifs. Le milieu M2 + 0,5% NaCl additionné d'antibiotiques s'est montré efficace en permettant une bonne récupération des actinomycètes à partir des milieux

naturels en comparaison avec les trois autres milieux utilisés. Ce criblage primaire est suivi par la recherche des antibiotiques produits par ces souches par deux techniques différentes. Les résultats très proches obtenus à partir des deux techniques utilisées, nous ont conduit à employer la méthode la plus simple pour rechercher l'activité antifongique. Ces tests ont révélé que toutes les souches d'actinomycètes isolées sont douées d'activité antibactérienne et/ou antifongique.

Une étude statistique par analyse de la variance des résultats obtenus a démontré que l'apparition des différentes activités antimicrobiennes chez une souche d'actinomycète est fonction des milieux de culture et des microorganismes cibles utilisés. Enfin, certains auteurs ont évoqué l'existence d'une relation étroite entre l'activité antimicrobienne des actinomycètes et leur écosystème naturel (Facteurs physico-chimiques et biologiques).

Généralement, l'activité antifongique est prédominante chez des actinomycètes isolés de milieux acides [21], ceci est en accord avec nos résultats concernant les souches à activité antifongique (A1, A4 et A5), ces dernières sont toutes isolées de l'échantillon E1 dont le pH est faiblement acide comparativement aux deux autres échantillons. L'objectif de ce travail qui consistait à isoler à partir d'un écosystème extrême des souches d'actinomycètes productrices de substances antimicrobiennes a été en grande partie atteint. Cependant pour valoriser ses travaux, il est nécessaire de les poursuivre par l'identification des cinq souches ainsi que l'extraction, la purification et la caractérisation des molécules bioactives.

## REFERENCES

- [1]- Données OMS "Principales causes de mortalité dans le monde en 1996", (1997).
- [2]- Higashide E. "The macrolides : properties, biosynthesis and fermentation" *Drugs pharm.Sci.*, **22**, (1984), pp. 452-508.
- [3]- Iwai Y. & Takahashi Y. "Selection of microbial sources of bioactives compounds" in «The search for bioactive compounds from microorganisms», Springer-Verlag, New York, (Ed.), (1992), pp. 281-302.
- [4]- Pochon J. "Manuel technique d'analyse microbiologique". Masson et Cie. Paris (Ed.), (1964), pp.5-20.
- [5]- Shomura T., Yoshida J., Amano S., Kojima, M. & Niida, T. "Studies on Actinomycetales producing antibiotics only in agar culture.1. Screening, taxonomy and morphology-productivity relationship of *Streptomyces halstedii*, Strain SF-1993". *J .antibiot.*, **32**, (1979), pp. 427-435.
- [6]- Takizawa M., Colwell R.R. & Hill R.T. "Isolation and Diversity of Actinomycetes in the Chesapeake Bay". *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**, (1993), pp. 997-1002.
- [7]- Tortorano A.M., Cabrini E. & Viviani M.A., "Sensibilité *in vitro* des levures à cinq antibiotiques. Comparaison de deux méthodes C.M.I. en gélose et méthode des disques", *Bull. Soc. Fr. Myc. Med.*, **8**, (1979), pp. 69-74.



- [8]- Williams S.T. & Cross T. "Actinomycetes" in «Methods in microbiology» Academic Press, London (Ed.), Vol.4, (1971), pp.295-3334.
- [9]- Crawford D.L., Lynch J.M., Whipps J.M. & Ousley M.A. "Isolation and Characterization of Actinomycetes Antagonists of a fungal Root pathogen", *Appl.Environ.Microbiol.*, **59**, **11**, (1993), pp.3899-3905.
- [10]- Weyland H. "Actinomycetes in north sea and Atlantic ocean sediment", *Nature*, **223**, (1969), pp. 858-860.
- [11]- Mincer T.J., Jenson P.R., Kauffman C.A. & Fenical W. "Widespread and Persistent Populations of a Major New Marine Actinomycetes Taxon in Ocean Sediments", *Appl. Environ.Microbiol.*, **68**, **10**, (2002),pp. 5005-5011.
- [12]- Jiang C. & Xu L. Diversity of Aquatic Actinomycetes in Lakes of the Middle Plateau, Yunnan, China, *Appl.Environ.Microbiol.*, **62**, **1**, (1996), pp. 249-253.
- [13]- Goodfellows M. & Williams S.T. "Ecology of Actinomycetes", *Ann.Rev.Microbiol.*, **37**, (1983), pp. 189-216.
- [14]- Marshall V.P., McWethy S.J., Visser J., Cialdella J.I. & Laborde A.L. "Current fermentation technology for the production of antibiotics from actinomycetes: the example of paulomycin, *Developments in Industrial Microbiology*", **28**, (1987), pp. 105-114.
- [15]- Okami Y. & Hotta K. "Search and discovery of new antibiotics" in «Actinomycetes in biotechnology». Academic Press, Orlando (Ed.), (1988), pp.33-67.
- [16]- Williams S.T., Locci R., Beswick A., Kurtboke D.I., Kuznetsov V.D., Le Monnier F.J., Long P.F., Maycroft K.A., Palma R.A., Petrolini B., Quaroni S., Todd J.I. & West M. "Detection and identification of novel actinomycetes". *Res. Microbiol.*, **144**, (1993), pp. 653-656.
- [17]- Kurtboke D.I. & Wildman H.G. "Assessing Australian biodiversity, towards an improved detection of Actinomycetes. *Actinomycetes*, **91**, **2** (1998),pp.10-13.
- [18]- Groth J., Vettermann R., Schutze B., Schumann P. & Saiz-Jimenz C. "Actinomycetes in Karstic caves of northern Spain (Altamira and Tito Bustillo)", *Journal of microbiological methods*, **36**, (1999), pp. 115-122.
- [19]- Bushell M.E. "Growth, Product Formation and fermentation Technology" in «Actinomycetes in Biotechnology», Academic Press London (Ed.), (1988), pp. 185-217.
- [20]- Deshayes C., Falconer C., Mazieres N., Sandler G, Sanglier J.J. & Sire B. "Selection des souches productrices et caractérisation des molécules actives" in «Biotechnologie des antibiotiques», Masson (Ed.), (1989), pp.72-138.
- [21]- Khan M.R. & Williams S.T. "Studies on the ecology of Actinomycetes in soil. Distribution and characteristics of acidophilic Actinomycetes", *Soil. Biol. Biochem.*, **7**, (1975), pp. 345-348.

**Tableau 3 :** Activité antibactérienne des souches actinomycètes isolées.

Souches Actinomycétales	Technique de la double couche							
	Activité sur milieu ISP-2 + 0,5%NaCl contre :				Activité sur milieu GBA contre :			
	<i>E.coli</i>	<i>P.aeruginosa</i>	<i>S.aureus</i>	<i>B.cereus</i>	<i>E.coli</i>	<i>P.aeruginosa</i>	<i>S.aureus</i>	<i>B.cereus</i>
A1	-	-	-	-	+	-	-	-
A2	-	-	-	+	-	-	+	-
A3	-	-	-	-	-	-	+	-
A4	-	-	+	++	-	-	+	+
A5	+	-	-	+	+	-	-	+
Technique des cylindres d'Agar								
A1	-	-	-	-	+	-	-	-
A2	-	-	-	+	-	-	+	-
A3	-	-	-	-	-	-	+	-
A4	-	-	+	++	+	-	+	+
A5	+	-	-	+	+	-	-	+



**Tableau 4 :** Activité antifongique des souches d'actinomyètes isolées.

Souches d'actinomyètes	Activité sur milieu ISP-2 + 0,5%NaCl contre :			Activité sur milieu GBA contre :		
	<i>C. albicans</i>	<i>A.niger</i>	<i>A.oryzae</i>	<i>C. albicans</i>	<i>A.niger</i>	<i>A.oryzae</i>
A1	-	-	-	+	-	-
A2	-	-	-	-	-	-
A3	-	-	-	-	-	-
A4	-	-	-	+	-	-
A5	-	-	+	-	+	++

(+) Zone d'inhibition <10 mm, (++) Zone d'inhibition ≥10mm.

**Tableau 5 :** Analyse de la variance des effets de la souche productrice, de la souche-test et du milieu de culture sur l'apparition des activités antimicrobiennes.

Antibactérienne					Antifongique				
Facteur	ddl	MC	F	Niveau p	Facteur	ddl	MC	F	Niveau p
1	1	0,2663	0,3073	0,579990	1*	1	35,50820	<b>261,8730</b>	0,000000
2*	4	129,0645	<b>148,9206</b>	0,000000	2*	4	18,25000	<b>134,5938</b>	0,000000
3*	3	77,9794	<b>89,9762</b>	0,000000	3*	2	10,98387	<b>81,0061</b>	0,000000
12*	4	11,0690	<b>12,7719</b>	0,000000	12*	4	6,25000	<b>46,0938</b>	0,000000
13*	3	16,4650	<b>18,9980</b>	0,000000	13*	2	7,88710	<b>58,1673</b>	0,000000
23*	12	64,7953	<b>74,7638</b>	0,000000	23*	8	22,70588	<b>167,4559</b>	0,000000
123*	12	7,4057	<b>8,5450</b>	0,000000	123*	8	9,29412	<b>68,5441</b>	0,000000

(\*) Effet significatif, (1) Milieu, (2) Souche, (3) Microorganisme-tests, (MC) Sommes des carrés moyennes, (ddl) Degrés de liberté, (F) Statistique du test de Fisher, (p) Probabilité attachée à la valeur de Fisher.

