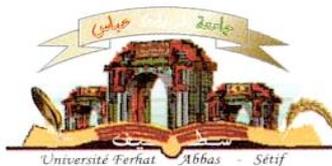


الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

Université Ferhat Abbas Sétif 1
Faculté des Sciences de la
Nature et de la Vie



جامعة فرحات عباس، سطيف 1
كلية علوم الطبيعة و الحياة

DEPARTEMENT DE MICROBIOLOGIE

N°...../SNV/2014

THÈSE

Présentée par

AMEUR Hanane

Pour l'obtention du diplôme de

DOCTORAT EN SCIENCES

Filière: **BIOLOGIE**

Spécialité: **MICROBIOLOGIE**

THÈME

**Effet d'osmoprotecteurs naturels sur la restauration de croissance
de *Streptomyces* et de plantes d'intérêt agricole sur sol salé ou aride**

Soutenue publiquement le 06/11/2014

DEVANT LE JURY

Président

Larous Larbi

Pr. UFA Sétif 1

Directeur

Ghoul Mostefa

Pr. UFA Sétif 1

Examineurs

Benguedouar Amar

Pr. Univ. Constantine 1

Nabti El Hafid

MCA. Univ. AM. Béjàia

Houali Karim

MCA. Univ. MM. Tizi Ouzou

Laboratoire de Microbiologie Appliquée

A ma très chère mère et à toute ma famille.

A mon mari et mes adorables fils : Mounir, Aymen, Anis et à ma jolie Sara.

Remerciements

Mes sincères remerciements vont d'abord à mon Directeur de thèse le **Pr. M. Ghoul** pour son soutien et sa coopération.

Je remercie particulièrement le **Pr. L. Laarous** d'avoir accepté de présider le jury.

Mes vifs remerciements sont adressés également aux membres de jury : **Pr. A. Benguedouar** (Université Constantine 1), **Dr. E. Nabti** (Université AM. Bèjàia) et **Dr. K. Houali** (Université MM. Tizi Ouzou) de m'avoir fait l'honneur de juger ce travail.

Toute ma gratitude et toute ma reconnaissance sont exprimées au **Pr. J. Selvin** de l'université de Bharathidasan, Tiruchirappalli (Inde) pour sa collaboration et son aide précieuse.

Je suis reconnaissante à Mr le **Pr. Aggoun** (Université de Sétif) pour son aide et sa disponibilité dans la réalisation de l'étude statistique.

Je n'oublie pas à exprimer chaleureusement mes remerciements à mon mari **Dr. L. Chibane** pour son soutien moral, son aide particulière et sa compréhension durant les moments difficiles tout au long de la réalisation de ce travail.

<i>Introduction générale</i>	01
<i>Revue Bibliographique</i>	
<i>Les actinomycètes: Caractéristiques et importance</i>	03
I- La microflore du sol	03
I-1. Les champignons	03
I-2. Les algues	04
I-3. Les protozoaires	04
I-4. Les bactéries	04
I-4-1. Les actinomycètes	05
I-4-2. Méthodes d'isolement des actinomycètes	06
I-4-3. Importance des actinomycètes	08
I-4-3-1. Production de l'acide indole acétique (AIA)	08
I-4-3-2. Production d'enzymes	09
I-4-3-3. Production de sidérophores	09
I-4-3-4. Production d'antibiotiques	10
I-4-3-5. Solubilisation du phosphore	11
I-4-3-6. Dégradation de la lignine	11
I-4-3-7. Autres intérêts	12
<i>Les bactéries et les plantes face au stress salin</i>	13
I- Les Bactéries face au stress salin	13
I-1. Caractéristiques des sols salés	13
I-2. Effet de la salinité sur la croissance bactérienne	13
I-3. Stratégies d'osmoadaptation	14
I-3-1. Le tréhalose	14
I-3-2. Le glycérol et l'écotine	15
I-3-3. La proline et le glutamate	15
I-3-4. La glycine bétaine	16
II- Effet de la salinité sur les plantes	17
II-1. Diminution de la germination	17
II-2. Diminution de l'absorption de l'eau et la disponibilité en nutriments	18
II-3. Génération des espèces oxygénées réactives (EOR)	18
II-4. Inhibition de la photosynthèse	19

III- Halotolérance des plantes	20
III-1. La glycine bétaine	20
III-2. La proline	20
III-3. Les sucres	21
III-4. Les caroténoïdes	21
<i>Les halophytes et l'osmorégulation</i>	22
I- Les halophytes et le stress salin	22
I-1. Classification	22
I-2. Stratégies d'osmoadaptation	22
I-2-1. Accumulation des ions Na ⁺ et K ⁺	23
I-2-2. La proline	23
I-2-3. La glycine bétaine	24
I-2-4. Les sucres solubles	24
<i>Matériels et méthodes</i>	
<i>I- Isolement des actinomycètes du sol</i>	25
I-1. Prélèvement du sol	25
I-2. Mesure de la salinité	25
I-3. Isolement des actinomycètes	25
I-4. Examens microscopique et macroscopique	26
I-5. Critères morphologiques d'identification	26
<i>II- Activités antibactérienne et antifongique et production de l'acide indole acétique</i>	27
II-1. Activité antibactérienne des actinomycètes	27
II-2. Activité antifongique des souches d'actinomycètes	27
II-3. Production de l'acide indole acétique	28
a- Préparation du réactif de Salkowsky	28
II-3-1. Etude des conditions optimales de la production de l'AIA	28
II-3-1-1. Effet du NaCl, du pH, de température et des concentrations du L-tryptophane	28
<i>III- Mise en évidence de l'halotolérance de Streptomyces sp. MADO2 et Nocardiosis sp. MADO3 et la souche SF5 isolée du sol</i>	29
III-1. Préparation de l'inoculum	29
a- Composition du milieu ISP2 (g/l)	29

II-2. Milieux d'étude de l'halotolérance	29
III-2-1. Composition du milieu M63 (g/l)	29
III-2-2. Composition du milieu glycérol asparagine (ISP5)	30
III-2-3- Milieux M63 et ISP5 additionnées de glycine bétaine (G.B), de proline et de tréhalose	30
<i>IV-Halotolérance de Streptomyces sp. MADO2 et de la souche actinomycétale isolée SF5 et l'osmoprotection apportée par l'halophyte Salsola vermiculata</i>	31
IV-1- Présentation	31
IV-2. Milieux préparés à partir des extrais aqueux de <i>S. vermiculata</i>	31
IV-3. Estimation de croissance bactérienne	31
IV-4. Milieux préparés à partir d'extrait hydro-alcoolique de <i>S. vermiculata</i>	31
IV-5. Mise en évidence de la croissance de la souche actinomycétale SF5 isolée en présence d'extrait hydro-alcoolique de <i>S. vermiculata</i>	32
<i>V- Effet de la souche actinomycétale SF5 et d'extrait aqueux d'halophyte sur la croissance du blé dur (Triticum durum L.)</i>	32
V-1. Germination des graines de blé	32
V- 2. Préparation d'extrait aqueux d'halophyte	32
V- 3. Estimation de la germination	33
V- 4. Etude de la croissance de <i>Triticum durum L.</i>	33
V- 4-1. Mesure de la croissance des plantes	34
V- 4-1-1. Mesure de la longueur de la tige	34
V- 4-1-2. Meure du poids sec des racines et des tiges	34
V-4-1-3. Mesure des teneurs des pigments photosynthétiques ; chlorophylles a, b et totale et caroténoïdes	34
V- 4-1-4. Détermination de la teneur en proline	34
V-5. Etude statistique	34
<i>Résultats et discussion</i>	
<i>I- Isolement des actinomycètes</i>	35
I-1. Discussion	36
<i>II- Mise en évidence des activités antibactérienne et antifongique</i>	40
II-1. Cas de <i>Streptomyces</i> sp MADO2 et <i>Nocardiosis</i> sp. MADO3	40
II-2. Cas des actinomycètes isolées du sol	42
II- 3. Discussion	44

III. Screening des souches d'actinomycètes productrices de l'acide indole acétique et optimisation des conditions de croissance et de production	45
III-1- Screening des actinomycètes productrices de l'AIA	45
III-2- Croissance de <i>Streptomyces</i> sp.SF5 et <i>Nocardiopsis</i> sp. MADO3 et production de l'acide indole acétique	46
III-2-1. Cas de <i>Streptomyces</i> sp. SF5	46
III-2-1-1. Effet des concentrations du L-tryptophane	46
III-2-1-2. Effet du pH	46
III-2-1-3. Effet de la température	47
III-2-1-4. Effet du NaCl	48
III-2-2. Cas de <i>Nocardiopsis</i> sp. MADO3	48
III-2-2-1. Effet des concentrations du L-tryptophane	48
III-2-2-2. Effet du pH	49
III-2-2-3. Effet de la température	50
III-2-2-4. Effet du NaCl	50
III-3. Discussion	51
IV- Croissance de <i>Streptomyces</i> sp. MADO2 et <i>Nocardiopsis</i> sp. MADO3 en milieux M63 et ISP5	54
IV-1. En absence de NaCl	54
IV-2. Effet d'osmolarités élevées sur la croissance bactérienne	55
IV-3. Effet de la GB, de la proline et du tréhalose sur la croissance bactérienne en présence de différentes concentrations de NaCl	56
IV-3-1. En présence de 0.1 M/NaCl	56
IV-3-2. En présence de 0.5 M/NaCl	57
IV-3-3. En présence de 0.8 M/NaCl	58
IV-3-4. En présence de 1 M/NaCl	59
IV-4. Discussion	60
V- Effet du sel et/ou <i>S. vermiculata</i> sur la croissance de <i>Streptomyces</i> sp. SF5 et de <i>Streptomyces</i> sp. MADO2	64
V-1. Croissance de <i>Streptomyces</i> sp.SF5 en M63	65
V-2. Croissance de <i>Streptomyces</i> sp.SF5 en ISP5	66
V-3. Croissance de <i>Streptomyces</i> sp.MADO2 en M63	67
V-4. Croissance de <i>Streptomyces</i> sp.MADO2 en ISP5	70

VI- Effet du sel sur la croissance de <i>Streptomyces</i> sp. SF5 en milieux M63 et ISP5 en présence de GB, de proline, de tréhalose et de <i>S. vermiculata</i>	72
VI-1. En présence de NaCl sans apport d'osmoprotecteurs	72
VI-2. Effet du sel, de GB, de proline, de tréhalose et de <i>S. vermiculata</i> sur la croissance bactérienne	72
VI-2-1. En absence de NaCl	72
VI-2-2. En présence de 0.1 M/NaCl	73
VI-2-3. En présence de 0.5 M/NaCl	74
VI-2-4. En présence de 0.8 M/NaCl	74
VI-2-5. En présence de 1M/NaCl	75
VI-3. Discussion	76
VII- Effet du NaCl, de <i>S. vermiculata</i>, de <i>Streptomyces</i> sp. SF5 et de <i>S. vermiculata</i>+ <i>Streptomyces</i> sp. SF5 sur la germination et la croissance de <i>Triticum durum</i> L.	81
VII-1. Germination des graines de <i>T. durum</i> L. dans l'eau distillée (boîtes) et sur sol	81
VII-1-1. Cinétique de germination des graines cultivées dans l'eau distillée (boîtes)	82
VII-1-2. Cinétique de germination sur sol	84
VII-2. Effet du NaCl, de <i>S. vermiculata</i> , de <i>Streptomyces</i> sp. SF5 et de <i>S. vermiculata</i> + <i>Streptomyces</i> sp. SF5 sur la longueur des racines de <i>Triticum durum</i> L cultivé en eau distillée (boîtes)	85
VII-2-1. Evolution de la longueur des racines	86
VII-3. Effet du NaCl, de <i>S. vermiculata</i> , de <i>Streptomyces</i> sp. SF5 et de <i>S. vermiculata</i> + <i>Streptomyces</i> sp. SF5 sur la longueur des tiges de <i>Triticum durum</i> L. cultivé en eau distillée	87
VII-3-1. Evolution de la longueur des tiges	87
VII-4. Effet du NaCl, de <i>S. vermiculata</i> , de <i>Streptomyces</i> sp. SF5 et de <i>S. vermiculata</i> + <i>Streptomyces</i> sp. SF5 sur le poids sec et la longueur des racines de <i>T. durum</i> cultivé sur sol	89
VII-5. Effet du NaCl, de <i>S. vermiculata</i> , de <i>Streptomyces</i> sp. SF5 et de <i>S. vermiculata</i> + <i>Streptomyces</i> sp. SF5 sur le poids sec et la longueur des tiges	90
VII-6 Effet du NaCl, de <i>S. vermiculata</i> , de <i>Streptomyces</i> sp. SF5 et de <i>S. vermiculata</i> + <i>Streptomyces</i> sp. SF5 sur l'accumulation de la proline	92
VII-7. Effet du NaCl, de <i>S. vermiculata</i> , de <i>Streptomyces</i> sp. SF5 et de <i>S.</i>	92

<i>vermiculata</i> + <i>Streptomyces</i> sp. SF5 sur les teneurs en chlorophylle a	
VII-8. Effet du NaCl, de <i>S. vermiculata</i> , de <i>Streptomyces</i> sp. SF5 et de <i>S.</i>	93
<i>vermiculata</i> + <i>Streptomyces</i> sp. SF5 sur les teneurs en chlorophylle b	
VII-9- Effet du NaCl, de <i>S. vermiculata</i> , de <i>Streptomyces</i> sp. SF5 et de <i>S.</i>	94
<i>vermiculata</i> + <i>Streptomyces</i> sp. SF5 sur les teneurs en chlorophylle totale	
VII-10- Effet du NaCl, de <i>S. vermiculata</i> , de <i>Streptomyces</i> sp. SF5 et de <i>S.</i>	95
<i>vermiculata</i> + <i>Streptomyces</i> sp. SF5 sur les teneurs en caroténoïdes	
VII-11. Discussion	98
<i>Discussion générale</i>	110
<i>Conclusion générale</i>	119
<i>Références bibliographiques</i>	121

Fig. 1	Effet des concentrations du L-tryptophane sur la croissance et la production de l'AIA chez <i>Streptomyces</i> sp. SF5	46
Fig. 2	Effet du pH sur la croissance et la production de l'AIA chez <i>Streptomyces</i> SF5	47
Fig. 3	Effet de la température sur la croissance et la production de l'AIA chez <i>Streptomyces</i> sp. SF5	47
Fig. 4	Effet du NaCl sur la croissance et la production de l'AIA chez <i>Streptomyces</i> sp. SF5	48
Fig. 5	Effet des concentrations du L-tryptophane sur la croissance et la production de l'AIA chez <i>Nocardiosis</i> sp. MADO3	49
Fig. 6	Effet du pH sur la croissance et la production de l'AIA chez <i>Nocardiosis</i> sp. MADO3	49
Fig. 7	Effet de la température sur la croissance et la production de l'AIA chez <i>Nocardiosis</i> sp. MADO3	50
Fig. 8	Effet du NaCl sur la croissance et la production de l'AIA chez <i>Nocardiosis</i> sp. MADO3	51
Fig. 9	Croissance de <i>Streptomyces</i> sp. MADO2 (A) et <i>Nocardiosis</i> sp. MADO3 (B) cultivés sur milieux M63 et ISP5	54
Fig. 10	Croissance de <i>Streptomyces</i> sp. MADO2 en présence de NaCl sur milieux M63 (A) et ISP5 (B)	55
Fig. 11	Croissance de <i>Nocardiosis</i> sp. MADO3 en présence de NaCl sur milieux M63 (A) et ISP5 (B)	55
Fig. 12	Croissance de <i>Streptomyces</i> sp. MADO2 sur milieux M63 (A) et ISP5 (B) en présence de 0.1/M NaCl et/ou de GB de proline et de tréhalose (1 mM)	56
Fig. 13	Croissance de <i>Nocardiosis</i> sp. MADO3 sur milieux M63 et ISP5 en présence de 0.1 M/NaCl et/ou de GB, de proline et de tréhalose (1 mM)	56
Fig. 14	Croissance de <i>Streptomyces</i> sp. MADO2 sur milieux M63 (A) et ISP5 (B) en présence de 0.5 M/NaCl et/ou de GB de proline et de tréhalose (1 mM)	57
Fig. 15	Croissance de <i>Nocardiosis</i> sp. MADO3 sur milieux M63 (C) et ISP5 (D) en présence of 0.5 M/NaCl et/ou de GB de proline et de tréhalose (1 mM)	57
Fig. 16	Croissance de <i>Streptomyces</i> sp. MADO2 sur milieux M63 (A) et ISP5 (B) en	58

	présence de 0.8 M/NaCl et/ou de GB, de proline et de tréhalose (1 mM)	
Fig. 17	Croissance de <i>Nocardiosis</i> sp. MADO3 sur milieux M63 (C) et ISP5 (D) en présence de 0.8 M/NaCl et/ou de GB de proline et de tréhalose (1 mM)	58
Fig. 18	Croissance de <i>Streptomyces</i> sp. MADO2 sur milieux M63 (A) et ISP5 (B) en présence de 1 M/NaCl et/ou de GB de proline et de tréhalose (1 mM)	59
Fig. 19	Croissance <i>Nocardiosis</i> sp. MADO3 sur milieux M63 (C) et ISP5 (D) en présence de 1 M/NaCl et/ou de G.B de proline et de tréhalose (1 mM)	59
Fig. 20	Restauration de la croissance de <i>Streptomyces</i> sp.SF5 par <i>S. vermiculata</i> en présence de NaCl (100, 500, 800 et 1000mM) en M63	64
Fig. 21	Restauration de la croissance de <i>Streptomyces</i> sp.SF5 par <i>S. vermiculata</i> en présence de NaCl (500, 800 et 1000mM) en ISP5	65
Fig. 22	Effet de <i>S. vermiculata</i> sur la croissance de <i>Streptomyces</i> sp. SF5 en présence de NaCl cultivé en M63	66
Fig. 23	Effet de <i>S. vermiculata</i> sur la croissance de <i>Streptomyces</i> sp. SF5 en présence de NaCl cultivé en ISP5	67
Fig. 24	Restauration de la croissance de <i>Streptomyces</i> sp.MADO2 par <i>S. vermiculata</i> en présence de NaCl (100, 500, 800 et 1000mM) en milieux M63 et ISP5	69
Fig. 25	Effet de <i>S. vermiculata</i> sur la croissance de <i>Streptomyces</i> sp. MADO2 en présence de NaCl en M63	70
Fig. 26	Effet de <i>S. vermiculata</i> sur la croissance de <i>Streptomyces</i> sp. MADO2 en présence de NaCl en ISP5	71
Fig. 27	Croissance de <i>Streptomyces</i> sp. SF5 en présence de concentrations croissantes de NaCl en milieux M63 (A) et ISP5 (B)	72
Fig. 28	Croissance de <i>Streptomyces</i> sp. SF5 en milieux M63 (A) et ISP5 (B) en absence de NaCl et/ou GB, proline, tréhalose (1 mM) et <i>S. vermiculata</i>	73
Fig. 29	Croissance de <i>Streptomyces</i> sp. SF5 en présence de 0.1M/NaCl en milieux M63 (A) et ISP5 (B) et/ou GB, proline, tréhalose (1 mM) et <i>S. vermiculata</i>	73
Fig. 30	Croissance de <i>Streptomyces</i> sp. SF5 en présence de 0.5M/NaCl en milieux	74

	M63 (A) et ISP5 (B) et/ou GB, proline, tréhalose (1 mM) et <i>S. vermiculata</i>	
Fig. 31	Croissance de <i>Streptomyces</i> sp. SF5 en présence de 0.8M/NaCl en milieux M63 (A) et ISP5 (B) et/ou GB, proline, tréhalose (1 mM) et <i>S. vermiculata</i>	75
Fig. 32	Croissance de <i>Streptomyces</i> sp. SF5 en présence de 1M/NaCl en milieux M63 (A) et ISP5 (B) et/ou GB, proline, tréhalose (1mM) et <i>S. vermiculata</i>	75
Fig. 33	Taux de germination de <i>T. durum</i> : (A), « sur boîtes de pétri » (B), « sur sol » en fonction des traitements appliqués	82
Fig. 34	Effet du NaCl (0, 100 et 200 mM) de <i>S.vermiculata</i> , de <i>Streptomyces</i> sp. SF5 et de <i>S.vermiculata</i> + <i>Streptomyces</i> sp. SF5 sur le nombre des graines germées de <i>Triticum durum</i> L. cultivé en eau distillée (boîtes)	83
Fig. 35	Effet du NaCl (0, 100 et 200 mM) de <i>S.vermiculata</i> , de <i>Streptomyces</i> sp. SF5 et de <i>S.vermiculata</i> + <i>Streptomyces</i> sp. SF5 sur le nombre des graines germées de <i>Triticum durum</i> L. cultivé sur sol	84
Fig. 36	Longueurs des racines de <i>Triticum durum</i> cultivé en eau distillée (boîtes) en fonction des traitements appliqués	85
Fig. 37	Evolution de la longueur des racines de <i>Triticum durum</i> L. en présence de NaCl (0,100 et 200 mM), de <i>S. vermiculata</i> , de <i>Streptomyces</i> sp. SF5 et de <i>S. vermiculata</i> + <i>Streptomyces</i> sp.SF5	86
Fig. 38	Effet du NaCl (0,100 et 200 mM), de <i>S. vermiculata</i> , de <i>Streptomyces</i> sp. SF5 et de <i>S. vermiculata</i> + <i>Streptomyces</i> sp.SF5 sur la longueur des tiges de <i>T. durum</i> cultivé en eau distillée (boîtes)	87
Fig. 39	Evolution de la longueur des tiges de <i>Triticum durum</i> L. en présence de NaCl (0,100 et 200 mM), de <i>S. vermiculata</i> , de <i>Streptomyces</i> sp. SF5 et de <i>S. vermiculata</i> + <i>Streptomyces</i> sp.SF5	88
Fig. 40	Effet du NaCl (0,100 et 200 mM), de <i>S. vermiculata</i> , de <i>Streptomyces</i> sp. SF5 et de <i>S. vermiculata</i> + <i>Streptomyces</i> sp. SF5 sur le poids sec et la longueur des racines chez <i>T. durum</i> cultivé sur sol	90
Fig. 41	Effet du NaCl (0,100 et 200mM), de <i>S. vermiculata</i> , de <i>Streptomyces</i> sp. SF5 et de <i>S. vermiculata</i> + <i>Streptomyces</i> sp. SF5 sur le poids sec et la longueur des tiges chez <i>T. durum</i> cultivé sur sol	91
Fig. 42	Effet du NaCl (0,100 et 200mM), de <i>S. vermiculata</i> , de <i>Streptomyces</i> sp. SF5 et de <i>S. vermiculata</i> + <i>Streptomyces</i> sp. SF5 sur la teneur en proline chez <i>T. durum</i> .	92
Fig. 43	Effet du NaCl (0,100 et 200 mM), de <i>S. vermiculata</i> , de <i>Streptomyces</i> sp. SF5 et	93

	de <i>S. vermiculata</i> + <i>Streptomyces</i> sp. SF5 sur la teneur en chlorophylle a chez <i>T. durum</i>	
Fig. 44	Effet du NaCl (0,100 et 200 mM), de <i>S. vermiculata</i> , de <i>Streptomyces</i> sp. SF5, et de <i>S. vermiculata</i> + <i>Streptomyces</i> sp. SF5 sur la teneur en chlorophylle b chez <i>T. durum</i> .	94
Fig. 45	Effet du NaCl (0,100 et 200mM), de <i>S. vermiculata</i> , de <i>Streptomyces</i> sp. SF5 et de <i>S. vermiculata</i> + <i>Streptomyces</i> sp. SF5 sur la teneur en chlorophylle totale chez <i>T. durum</i>	95
Fig. 46	Effet du NaCl (0,100 et 200mM), de <i>S. vermiculata</i> , de <i>Streptomyces</i> sp. SF5 et de <i>S. vermiculata</i> + <i>Streptomyces</i> sp. SF5 sur la teneur en caroténoïdes chez <i>T. durum</i>	96
Fig. 47	Cercle de corrélation de l'ACP des différents traitements (sans sel)	97
Fig. 48	Cercle de corrélation de l'ACP des différents traitements (NaCl/100mM)	97
Fig. 49	Cercle de corrélation de l'ACP des différents traitements (NaCl 200mM)	98
Fig. 50	Croissance de <i>Triticum durum</i> L. en présence de NaCl	100
Fig. 51	Croissance de <i>Triticum durum</i> L. en absence et présence de <i>S. vermiculata</i>	101
Fig. 52	Croissance de <i>Triticum durum</i> L. en présence NaCl/100mM, de <i>Streptomyces</i> sp. SF5+100mM et <i>S. vermiculata</i> +100mM	101
Fig. 53	Croissance de <i>Triticum durum</i> L. à NaCl (0, 100 et 200mM) en présence de <i>S. vermiculata</i> + <i>Streptomyces</i> sp. SF5	102
Fig. 54	Croissance de <i>Triticum durum</i> L. en présence NaCl/200mM, de <i>Streptomyces</i> sp. SF5+200mM, de <i>S. vermiculata</i> +200mM et <i>S. vermiculata</i> + <i>Streptomyces</i> sp.+ 200Mm.	103
Fig. 55	Croissance de <i>Triticum durum</i> L. à NaCl (100 et 200mM) en présence de <i>Streptomyces</i> sp. SF5	104

Tab.1	Nombre des microorganismes du sol sur une profondeur de 0 à 15 cm	03
Tab.2	Clés de détermination des différents genres d'actinomycètes basée sur la composition chimique de la paroi	05
Tab. 3	Quelques méthodes d'isolement d'actinomycètes à partir du sol	06
Tab. 4	Effet de prétraitements pour la récupération des actinomycètes	07
Tab. 5	Influence de trois milieux d'isolement sur la récupération d'actinomycètes à partir d'un sol salé	07
Tab.6	Effets du stress salin sur quelques plantes d'intérêt alimentaire	17
Tab. 7	Les différentes classes d'halophytes	22
Tab. 8	Composition des 12 traitements (T) pour l'étude de la germination et la croissance de <i>Triticum durum</i> L.	33
Tab. 9	Caractères morphologiques des mycélium aérien et végétatif des actinomycètes isolées sur milieu amidon-caséine	35
Tab. 10	Efficacité de quelques milieux sélectifs dans l'isolement des actinomycètes	38
Tab. 11	Fréquence des genres d'actinomycètes dans différents types de sol	39
Tab. 12	Effet antagoniste de <i>Streptomyces</i> sp. MADO2 et <i>Nocardiopsis</i> sp MADO3 vis-à-vis quelques souches bactériennes pathogènes	40
Tab. 13	Activité antifongique de <i>Streptomyces</i> sp. MADO2 et <i>Nocardiopsis</i> sp MADO3 vis-à-vis de <i>A. niger</i> , <i>A. flavus</i> et <i>P. citrinum</i>	40
Tab. 14	Activité antimicrobienne de <i>Streptomyces</i> sp. MADO2 et <i>Nocardiopsis</i> sp. MADO3 vis-à-vis quelques souches pathogènes	41
Tab. 15	Effet antagoniste des souches actinomycétales isolées du sol vis-à-vis quelques souches bactériennes pathogènes	42
Tab. 16	Activité antifongique des actinomycètes isolées du sol vis-à-vis de <i>A. niger</i> , <i>A. flavus</i> et <i>P. citrinum</i>	43
Tab. 17	Production de l'AIA par les différentes souches actinomycétales du sol et celles de référence (MADO2 et MADO3)	45
Tab. 18	Production de l'AIA ($\mu\text{g/ml}$) par des souches de <i>Azotobacter</i> (AZS) et de	52

Pseudomonas (PS) après 15 et 7 jours d'incubation respectivement

- Tab. 19** Comparaison du comportement de *Streptomyces* sp. et *Nocardopsis* sp. vis-à-vis le NaCl sur milieux M63 et ISP en présence de GB, de proline et de tréhalose **60**
- Tab. 20** Facteurs d'amélioration de la croissance de *Streptomyces* sp. SF5 et de *Streptomyces* sp. MADO2 cultivés en milieux M63 et ISP5 par *S. vermiculata* en présence de NaCl **77**
- Tab. 21** Facteurs d'amélioration de la croissance de *Streptomyces* sp. SF5 en M63 en présence de *S. vermiculata*, de GB, de proline et de tréhalose **78**
- Tab. 22** Facteurs d'amélioration de la croissance de *Streptomyces* sp. SF5 en ISP5 en présence de *S. vermiculata*, de GB, de proline et de tréhalose **79**

Résumé

Sept souches actinomycétales sont isolées d'un sol fertile de la région d'El-Ourissia (Nord de Sétif) sur le milieu amidon-caséine. La souche SF5 et celle de référence *Nocardiopsis* sp. MADO3 produisent les teneurs les plus élevées en acide indole acétique (55,58 et 39,38 µg/ml respectivement). Elles sont actives contre certains champignons et bactéries. *Streptomyces* sp. MADO2 (souche de référence) possède également cette activité antimicrobienne. Les colonies matures de la souche SF5 sont sèches, poudreuses, à bords plats et à contours irréguliers. Cette forme est caractéristique des colonies du genre *Streptomyces*. La couleur du mycélium aérien est blanche, tandis qu'elle est jaune sur mycélium végétatif, elles ont aussi une odeur du sol caractéristique du genre *Streptomyces*. En se basant sur les caractères morphologiques et culturaux, cet isolat est désigné comme étant *Streptomyces*.

Streptomyces sp. SF5 et les souches MADO2 et MADO3 sont halophiles modérées. La teneur en NaCl ainsi que la nature du milieu de culture influencent fortement sur leur halotolérance. L'effet osmoprotecteur de la glycine bêtaïne, de la proline et du tréhalose sur la restauration de la croissance de *Streptomyces* sp. et *Nocardiopsis* sp. est évident à des concentrations salines inhibitrices (500, 800 et 1000 mM), cependant, à de faibles osmolarités (100 mM), ils inhibent leur développement. L'extrait de *Salsola vermiculata* osmoprotège *Streptomyces* sp. SF5 et *Streptomyces* sp. MADO2 en présence de fortes teneurs de NaCl.

La germination de *Triticum durum* L, les longueurs des racines et des tiges, le poids sec des tiges, les teneurs en chlorophylles a, b et en caroténoïdes sont fortement inhibées par le NaCl, principalement à 200 mM. Cet effet est plus prononcé sur les paramètres étudiés en présence de *S. vermiculata* combinée avec *Streptomyces* sp. SF5. Les taux de germination sur sol en présence de NaCl (0, 100 et 200 mM) sont respectivement de 46.66%, 40% et 26.6% par comparaison aux témoins (100%, 80% et 53.2%). Cependant, l'apport séparé de *S. vermiculata* ou de *Streptomyces* sp. SF5 restaure efficacement la germination et la croissance de *Triticum durum* L. Les taux de germination sont respectivement de (86.6%, 86.6%) (100mM) et (86.6%, 93.2%) (200 mM) par rapport aux échantillons salés (80% et 53.2%). L'apport de cette halophyte et de *Streptomyces* sp. SF5 à des sols salés serait extrêmement utile pour lutter contre ce stress et améliorer les rendements agricoles.

Mots clés : Actinomycètes, *Streptomyces* SF5, glycine bêtaïne, proline, tréhalose, *Salsola vermiculata*, stress salin, effet osmoprotecteur, *Triticum durum* L.

Abstract

Seven actinomycetes strains were isolated from a fertile soil. SF5 and *Nocardiopsis* sp. MADO3 strains produced high levels of acetic indol acid (55.58µg/ml and 39.38µg/ml respectively). They showed also an antimicrobial activity against some bacteria and fungi beside *Streptomyces* sp. MADO2.

Streptomyces colonies can be easily identified by their opaque, rough non-spreading morphology and their earthy odor. Based on cultural and morphological characters, this isolate is designated as *Streptomyces*.

The three actinomycete *strains* are moderately halophiles and their behavior towards salt stress is different depending on the degree of salinity and the culture medium. The osmoprotective effect of glycine betaine, proline and trehalose on the restoration of the growth of *Streptomyces* sp. and *Nocardiopsis* sp. is obviously in the presence of high osmolarities. However, at low osmolarities they inhibit their growth. *Salsola vermiculata* showed a potential osmoprotective action on the restoration of the growth of *Streptomyces* sp. SF5 and *Streptomyces* sp. MADO2.

Germination of *Triticum durum* L. the lengths and the dry weight of roots and steams, chlorophyll a, b and carotenoids contents were strongly inhibited mainly at 200mM/NaCl. However, it should be noted that the inhibitory effect on these parameters is more pronounced in the presence of *S. vermiculata* combined with *Streptomyces* sp. Germination rates in soil at (0, 100 and 200 mM/NaCl are respectively 46.66%, 40% et 26.6% compared to controls (100%, 80% et 53.2%). Separately application of *S. vermiculata* or *Streptomyces* sp.SF5 restores strongly germination and growth of *Triticum durum* L. Germination rates are respectively (86.6%, 86.6%) (100mM) and (86.6%, 93.2%) (200 mM) compared to salted controls (80% and 53.2%). The use of this halophyte and *Streptomyces* sp. SF5 in saline soils would be extremely useful to fight against this stress and improve crop yields.

Key words: Actinomycetes, *Streptomyces* sp.SF5, glycine betaine, proline, trehalose, *Salsola vermiculata*, salinity stress, osmoprotective effect, *Triticum durum* L.

ملخص

تم عزل سبع سلالات من البكتيريا الخيطية من تربة خصبة بمنطقة الأوريسيا (شمال سطياف). السلالتان SF5 و *Nocardiosis sp.* MADO3 تنتجان كميات معتبرة من أندول حمض الخل 39.38 و 55.58 $\mu\text{g/ml}$ على التوالي.

تبين أن السلالتين لهما فعالية مهمة ضد بعض البكتيريا و الفطريات وذلك إلى جانب *Streptomyces sp.* MADO2 مستعمرات *Streptomyces* يمكن تمييزها بملمسها الخشن و لا يمكن نزعها بسهولة من وسط الزرع و لها رائحة ترابية بناء على الخصائص الزراعية و المرفولوجية يمكن تقريبها إلى نوع *Streptomyces*. السلالات الثلاثة محبة لملوحة معتدلة، و يختلف سلوكها اتجاه الإجهاد الملحي تبعاً لدرجة الملوحة و نوع وسط الزرع. *glycine betaine* و *proline* و *tréhalose* هي ذات فعالية كبيرة في الوقاية من الضغط الأسموزي لكل من *Nocardiosis sp.* *Streptomyces sp.* في تراكيز عالية الملوحة بينما في تراكيز منخفضة الملوحة فهي تؤثر سلباً على النمو. *Salsola vermiculata* تقي من الملوحة العالية و بفعالية كبيرة لكل من *Streptomyces sp.* MADO2 و *Streptomyces sp.* SF5.

الإنتاش، الأطوال و الوزن الجاف للجذور و السيقان وكذا نسب الكلوروفيل و الكريتينييد تأثرت سلباً خصوصاً في درجة ملوحة 200 mM بالنسبة لـ *Triticum durum L.* التثبيط كان حاداً في وجود *Salsola vermiculata* و *Streptomyces sp.* معاً. نسب الإنتاش في درجة ملوحة 0 ، 100 و 200 mM كانت على التوالي: 46.66% و 40% و 26.6% . إضافة *Salsola vermiculata* أو *Streptomyces sp.* كل حدى له تأثير فعال على إنتاش و نمو *Triticum durum L.* نسب الإنتاش كانت على التوالي 86.6% (100mM) و 93.2% ، 86.6% (200mM) مقارنة بالشواهد (80% و 53.2%). إستعمال هذه النبتة الملحية و كذا *Streptomyces sp.* في التربة الملحية يساهم بفعالية في مقاومة الإجهاد الملحي و تحسين المنتج الزراعي.

الكلمات المفتاحية: البكتيريا الخيطية، *Streptomyces sp.* SF5، *Salsola vermiculata*، *tréhalose*، *proline* *glycine betaine*، الإجهاد الملحي، الوقاية من الضغط الأسموزي، *Triticum durum L.*

INTRODUCTION

Introduction

La salinité des sols est l'un des facteurs limitant la productivité végétale et le rendement agricole (Baatour *et al.*, 2004). Selon le programme des nations unies de l'environnement, 20% des surfaces agricoles sont affectées par la salinité (Ghassemi *et al.*, 1995; Flowers et Yeo, 1995). Chez les plantes et en présence de fortes teneurs en chlorure de sodium, de nombreux processus physiologiques sont sensiblement affectés: la germination, la croissance, la photosynthèse, le métabolisme et la disponibilité en nutriments (Ayala-Astorga et Alcaraz-Meléendez, 2010). Parmi les récoltes les plus largement consommées, le blé occupe une place de choix, il s'adapte aux divers types de stress et est considéré comme halotolérant modéré. Toutefois lorsque la salinité dépasse 100mM, la germination et les autres paramètres liés à la croissance sont considérablement inhibés (Maghsoudi et Maghsoudi, 2008).

En effet, pour résoudre le problème de la salinité et afin de limiter les effets délétères du NaCl sur les plantes, certaines méthodes sont appliquées telles que le drainage et l'utilisation de l'eau d'irrigation mais elles sont assez difficiles et coûteuses ce qui limite leur utilisation. La voie biologique constitue la stratégie la plus fiable, elle consiste à utiliser des engrais verts (halophytes) ou de biofertilisants (bactéries : *Azospirillum*, *Rhizobium*, *Pseudomonas* et actinomycètes). Les actinomycètes sont considérées le groupe dominant de la population tellurique (Küster, 1968). Elles sont impliquées dans la décomposition de la matière organique (Hoster *et al.*, 2005), la production des antibiotiques, des vitamines et des enzymes (de Boer *et al.*, 2005). De plus, certaines souches sont capables de solubiliser du phosphore (Crawford *et al.*, 1993) et de produire l'acide indole acétique (Matsukawa *et al.*, 2007). Cette phytohormone est la principale forme des auxines responsable de la régulation de nombreux processus cellulaires telles que la division cellulaire, l'élongation et la différenciation (Hussein *et al.*, 2011). Toutefois sous stress salin, la croissance des microorganismes diminue significativement en présence de 5% de NaCl (Omar *et al.*, 1994). Les micro-organismes et les plantes répondent aux effets toxiques des ions Na^+ et Cl^- par la synthèse de solutés organiques afin de contrôler les activités hydriques internes, de maintenir le volume cellulaire approprié et de protéger les macromolécules intracellulaires (da Costa *et al.*, 1998; Lamosa *et al.*, 1998). Les solutés compatibles les plus largement accumulés par les microorganismes sont des sucres (tréhalose), des polyols (glycérol), des imino-acides (proline et éctoine), des acides aminés (glutamate) et des bétaines (glycine bétaine) (Gouffi *et al.*, 1998). Les halophytes, plantes

adaptées aux environnements salés, accumulent principalement des sucres solubles, de la proline et de la glycine bétaine (Driouich *et al.*, 2001; Denden *et al.*, 2005). Des teneurs intracellulaires importantes en glycine bétaine sont trouvées chez de nombreuses *Chenopodiaceae*: *Salsola*, *Sarcocornia* sp. *Atriplex* sp. *Halosarcina* sp...etc (Rhodes et Hanson, 1993).

L'objectif de notre étude est d'utiliser des souches actinomycétales capables de produire l'acide indole acétique même dans des conditions des stress salin. De plus, l'effet de l'apport d'extrait d'halophyte sur la germination et la croissance du blé dur (*Triticum durum* L.) en présence de concentrations salines inhibitrices est parallèlement examiné.

Pour ce faire, nous nous proposons dans un premier temps à l'isolement des actinomycètes et la sélection de la souche produisant les teneurs les plus importantes en acide indole acétique. Dans un second temps, l'addition de la glycine bétaine, de la proline, du tréhalose et d'extrait hydroalcoolique de l'halophyte, *Salsola vermiculata* (*Chenopodiaceae*) est étudié en présence de concentrations croissantes de NaCl sur la croissance de la souche isolée et des souches de référence *Streptomyces* sp. MADO2 et *Nocardiosis* sp. MADO3. D'un autre côté, l'apport de l'extrait aqueux de *S. vermiculata* et/ou de la souche actinomycétale isolée sur la germination et la croissance de *Triticum durum* L. est aussi mené. L'étude de la germination est réalisée dans l'eau distillée (boîtes de pétri), alors que celle de la croissance est réalisée sur sol en présence de 0, 100, et 200mM/NaCl.

REVUE

BIBLIOGRAPHIQUE

Les actinomycètes: Caractéristiques et importance

Le sol est un environnement où cohabitent les racines des végétaux, les animaux et les microorganismes, c'est un assemblage complexe de substances minérales et organiques, de gaz et d'eau, à l'intérieur duquel se déroulent simultanément des phénomènes de dégradation et de synthèse. A cause de son hétérogénéité, il abrite des populations de microorganismes à des particularités biologiques et biochimiques très diverses. L'activité de ces populations est influencée par divers facteurs : température, pH, profondeur du sol, humidité et présence des substances organiques et inorganiques. Les microorganismes présents dans le sol sont impliqués dans le recyclage de nombreux éléments chimiques (carbone, azote, phosphore, soufre, du fer et d'autres), surtout ceux impliqués dans la formation et la dégradation de l'humus et ceux ayant un rôle important dans la solubilisation des composants organiques et inorganiques inaccessibles aux plantes (Carp-Carare *et al.*, 1997).

I- La microflore du sol

La microflore tellurique est principalement dominée par les bactéries dont les actinomycètes, les champignons, les algues et les protozoaires. Les bactéries et les champignons sont les organismes dominants (Tab.1) (Hoorman et Islam, 2010).

Tab.1 : Nombre des microorganismes du sol sur une profondeur de 0 à 15 cm

Microorganismes	Nombre (g/sol)	Biomasse (g/m²)
Bactéries	10 ⁸ -10 ⁹	40-500
Actinomycètes	10 ⁷ -10 ⁸	40-500
Champignons	10 ⁵ -10 ⁶	100-1500
Algues	10 ⁴ -10 ⁵	1-50
Protozoaires	10 ³ -10 ⁴	variée

I-1. Les champignons

Les champignons du sol peuvent être des champignons supérieurs (basidiomycètes et ascomycètes), des levures ou des champignons inférieurs, souvent regroupés sous le nom de moisissures (*Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Trichoderma*, *Mucor*, etc.). Ils sont hétérotrophes et leur nombre varie de 10⁵ à 10⁶ cellules/g de sol (Maier *et al.*, 2000). Les populations fongiques exigent la richesse du sol en matière organique. Dans les sols riches, elles oscillent entre 1 et 2 tonnes à l'hectare. Les champignons interviennent principalement dans la dégradation des sucres complexes (cellulose, lignine) et dans les

processus d'ammonification (dégradation des matières azotées). La grande majorité de ce groupe microbien est saprophyte, mais un bon nombre d'espèces sont des parasites redoutables. Certaines espèces vivent en symbiose avec les plantes supérieures (mycorhizes) et leurs apportent des éléments nutritifs, essentiellement le phosphore, utiles à la croissance et d'autre part elles renforcent leurs défenses naturelles vis-à-vis le stress biotique ou abiotique (Alexander, 1977).

I-2. Les algues

Les algues sont photoautotrophes et sont surtout présentes sur la surface du sol ou en subsurface pour recevoir un minimum d'éclairage nécessaire pour la photosynthèse. Certaines sont hétérotrophes (Euglènes) peuvent vivre plus profondément. De nombreuses algues sont entourées d'une couche mucilagineuse abritant de nombreuses bactéries. Elles sont de l'ordre de 5000 à 10000 cellules/g de sol. (Maier *et al.*, 2000). Quatre groupes majeurs sont retrouvés dans le sol, il s'agit des algues vertes, vert-jaune ou rouges et des cyanobactéries. Elles participent aux processus de formation de sol, certaines espèces ont la capacité de fixer l'azote (Wild, 1993).

I-3. Les protozoaires

La plupart sont hétérotrophes, certains sont phototrophes; ils se nourrissent de bactéries, de levures, de champignons et d'algues, ils peuvent être impliqués dans la décomposition de la matière organique (Maier *et al.*, 2000 ; Wild, 1993).

I-4. Les bactéries

Les bactéries aérobies du sol participent essentiellement dans les réactions d'oxydation de la matière organique alors que celles anaérobies assurent les réactions de réduction au cours de fermentations. Les hétérotrophes peuvent être saprophytes, elles minéralisent la matière organique morte (nécromasse), d'autres sont appelées « humifiantes » (Vitousek, 1991). Les bactéries autotrophes sont capables de tirer leur énergie et leurs matériaux de construction essentiellement à partir de substances minérales. Dans le sol, un nombre considérable de ces dernières jouent un rôle important, en particulier dans les cycles biogéochimiques. Parmi celles intervenant dans le cycle de l'azote, on peut citer les bactéries nitrifiantes (*Nitrosomonas*, *Nitrosococcus*), nitriques (*Nitrobacter*) et réorganisatrices qui utilisent les nitrates pour synthétiser des molécules organiques azotées. Certaines bactéries dénitrificatrices respirent les nitrates en anaérobiose en libérant le N₂. Les bactéries semi-autotrophes assimilent une source d'azote

minérale et une source de carbone organique et fixent l'azote. Certaines sont libres dans les sols (*Azotobacter*, *Clostridium*), d'autres vivent en symbiose, par exemple avec les légumineuses (*Rhizobium*). Quelles soient autotrophes, hétérotrophes, aérobies ou anaérobies, toutes exigent des conditions abiotiques assez strictes : un pH neutre, une humidité moyenne, une température plutôt basse (bactéries psychrophiles) et différents oligoéléments (Vitousek, 1991).

I-4-1. Les actinomycètes:

Elles constituent une proportion importante de la microflore tellurique (10^4 - 10^6 UFC/ml) (Shrivastava *et al.*, 2008) et (10^7 - 10^8 UFC/ml) (Hoorman et Islam, 2010). Une grande difficulté de la classification des actinomycètes existe, elle est généralement basée sur les caractères morphologiques et la couleur du mycélium aérien et végétatif. A ceci, s'ajoute l'analyse de la composition chimique de la paroi cellulaire. Les différents groupes d'actinomycètes sont définis par la présence de l'acide diaminopimélique qui s'ajoute à certains acides aminés et sucres (ou les deux à la fois) (Tab.2) (Pridham, 1965).

Tab.2 : Clés de détermination des différents genres d'actinomycètes basée sur la composition chimique de la paroi (Lechevalier et Lechevalier, 1980).

Type de la paroi	Constituants majeurs	Genres
I	LL- D. A. P et glycine	<i>Streptomyces</i>
II	méso- D. A. P. et glycine	<i>Micromonospra</i>
III	méso- D. A. P.	<i>Actinomadura</i>
IV	méso-. D. A. P, arabinose et galactose	<i>Nocardia</i>
V	lysine et ornithine	<i>Actinomyces</i>
VI	Lysine	<i>Oerskovia</i>
VII	D. A. B et glycine	<i>Agromyces</i>
VIII	Ornithine	<i>Cellulomonas</i>

I-4-2. Méthodes d'isolement des actinomycètes

Les méthodes sélectives d'isolement de ces microorganismes sont très importantes afin d'étudier leur écologie et la sélection des souches d'importance industrielle. Elles impliquent l'utilisation des milieux de culture sélectifs, surtout ceux additionnés d'antibiotiques. Les prétraitements sont indispensables en vue de favoriser l'isolement de certaines souches actinomycétales et d'empêcher la croissance des microorganismes indésirables (Hayakawa, 2008) (Tab. 3 et 4).

Tab. 3: Quelques méthodes d'isolement d'actinomycètes à partir du sol (Hayakawa, 2008).

Prétraitement	Milieu de culture	Genres isolés
<u>Physique</u> : Aucun Chauffage (120°C/1h).	HV agar avec ou sans acide nalidixique et triméthoprime	<i>Streptomyces</i> et autres genres
	HV agar avec acide nalidixique	Plusieurs actinomycètes rares (<i>Spirilliplanes</i>)
<u>Chimique</u> : SDS 0.05% et extrait de levure 5%.	HV agar et acide nalidixique	<i>Streptomyces</i> et autres genres
<u>Physique et chimique</u> : Chauffage (110°C/1h) et phénol (1%).	HV agar avec kanamycine, josamycine, lysozyme et acide nalidixique	<i>Actinomadura viridis</i>
<u>Enrichissement</u> Réhydratation (30°C/90 min, 1500×g/20 min). Incubation en présence d'humidité et séchage	HV agar avec acide nalidixique et triméthoprime	<i>Actinoplanes</i> , <i>Actinosynnema</i> , <i>Actinokineospora</i> , <i>Kineosporia</i> ,
	HV agar avec acide nalidixique et triméthoprime	<i>Streptomyces</i> et autres genres

Tab. 4: Effet de prétraitements pour la récupération des actinomycètes (El-Nakeeb et Lechevalier, 1962).

Prétraitement	Pourcentage des actinomycètes de la population microbienne totale	Actinomycètes milliers/g du sol
Carbonate de calcium	81	9.750
Propionate de sodium	58	90
Phénol	35	21
Centrifugation (1500×g/20 min)	45	13

La caséine, l'amidon (Hagedorn, 1976), la chitine et l'acide humique constituent des substrats sélectifs pour isoler les actinomycètes rares (Cho *et al.*, 1994). Le milieu Amidon-Caséine est utilisé par de nombreux auteurs pour l'isolement de *Streptomyces* à partir des sols arides (Hagedorn, 1976). Le milieu Amidon-Caséine est considéré un milieu de choix permettant un bon développement du mycélium aérien et est considéré comme étant le milieu le plus approprié pour la sélection et la croissance des actinomycètes (Williams et Davies, 1965). La composition du milieu de culture est à considérer, elle influence considérablement le nombre des actinomycètes récupérées du sol (Cai *et al.*, 2009) (Tab. 5).

Tab. 5: Influence de trois milieux d'isolement sur la récupération d'actinomycètes à partir d'un sol salé (Quinghai Lake, Chine) (Cai *et al.*, 2009).

	Milieu Amidon-Caséine	Milieu amidon ammonium	Glycérol- asparagine agar
Nombre des actinomycètes mésophiles	1.38.10 ⁶	2.2.10 ⁶	2.18.10 ⁶
Nombre des actinomycètes cryophiles	1.2.10 ⁵	5.81.10 ⁴	7.84.10 ⁴

I-4-3. Importance des actinomycètes

Les activités microbiennes au niveau du sol accroissent la vitesse de synthèse et de minéralisation de la matière organique permettant ainsi une bonne nutrition pour les plantes. Les actinomycètes occupent une place de choix en raison de leurs nombreuses activités (Ames *et al.*, 1987, Hayakawa et Nonomura, 1989, Jarak *et al.*, 2006).

En plus de leur rôle dans la décomposition de la matière organique (Hoster *et al.*, 2005). Les actinomycètes sont connues pour leur production de substances biologiquement actives telles les antibiotiques, les vitamines et les enzymes (de Boer *et al.*, 2005). Certaines espèces ont la capacité de solubiliser le phosphore (Crawford *et al.*, 1993). D'autres sont également impliquées dans le contrôle phytopathologique et dans la production des composés antifongiques (Riedlinger *et al.*, 2006).

I-4-3-1. Production de l'acide indole acétique (AIA)

Les phytohormones sont des auxines, des gibbérellines ou de l'éthylène (Ahmad *et al.*, 2005). Parmi les auxines, l'acide indole acétique (AIA) occupe une place de choix. Il est issu du métabolisme du L-tryptophane chez de nombreux microorganismes (Ghosh et Basu, 2006), (bactéries (Muller *et al.*, 1989), champignons (Stein *et al.*, 1990) et algues (Finnie et Van Staden, 1985). L'AIA est aussi produit par les jeunes feuilles et les graines de végétaux à partir de réactions de transamination et de décarboxylation du L-tryptophane (Sachdev *et al.*, 2009). En général, le L-tryptophane constitue le précurseur principal pour l'AIA (Chung et Tzeng, 2004). Les microorganismes telluriques utilisent les sources naturelles de tryptophane et améliorent la croissance des plantes (Narayana *et al.*, 2009). Les bactéries productrices des phytohormones sont considérées comme de véritables régulateurs de la croissance végétale dans des conditions de stress salin (Perrig *et al.*, 2007).

L'AIA influence plusieurs paramètres physiologiques chez la plante, à savoir l'élongation et la division cellulaire, la dormance apicale, la différenciation des tissus vasculaires, la production d'éthylène, l'initiation racinaire (Keyeo *et al.*, 2011) et la prolifération racinaire aboutissant ainsi à une meilleure disponibilité en eau et en nutriments (Ashrafuzzamann *et al.*, 2009). Selon Matsukawa *et al.* (2007), chez de nombreuses espèces de *Streptomyces*, l'AIA stimule la formation du mycélium et améliore également la production des antibiotiques.

I-4-3-2. Production d'enzymes

Les actinomycètes synthétisent des chitinases, des glucanases, des peroxydases (Tokala *et al.*, 2002) et des glutaminases (Divya Teja *et al.*, 2014). Des espèces de *Streptomyces* produisent des amylases, des cellulases et des hémi-cellulases. D'autres sont capables de dégrader la lignine. *Streptosporangium* sp. isolé à partir des feuilles de maïs produit des glucoamylases exploitées en industrie afin de dégrader l'amidon (Hasegawa *et al.*, 2006). Les lipases sont aussi produites par certaines souches actinomycétales, ces enzymes catalysent l'hydrolyse des triglycérides en diglycérides, en monoglycérides, en glycérol et en acides gras (Sommer *et al.*, 1997). La production d'enzymes chinolytiques (chitinases et cellulases) par *Streptomyces albovinaceus*, *S. caviscabies*, *S. griseus*, *S. setonii* et *S. virginiae* est considérée comme l'action antagoniste la plus efficace dans le contrôle de certaines maladies fongiques en raison de leur action directe sur les chitinases (Macagnan *et al.*, 2008). Les protéases sont parmi les enzymes les plus importantes, elles constituent plus de 65% des applications industrielles totales comme agents blanchisseurs dans les détergents ou dans la synthèse des peptides. *Nocardiopsis* sp. NCIM 5142 et *Streptomyces pactum* DSM 40530 sont parmi les actinomycètes les plus exploitées dans la production des peptides (Thumar et Singh, 2007).

I-4-3-3. Production de sidérophores

Le fer est considéré comme le micro-élément le plus important utilisé par les bactéries, il joue également le rôle de cofacteur de nombreuses enzymes et protéines (Djibaoui et Bensoltane, 2005). Dans des conditions aérobies à pH neutre ou alcalin, cet élément est retrouvé dans la nature sous des formes insolubles dont elles ne peuvent pas être assimilées par les plantes et les bactéries. Ces dernières ont développé de nombreux systèmes de chélation de fer à partir de l'environnement qui utilisent le plus souvent les sidérophores ayant l'affinité la plus élevée pour le fer. Les sidérophores sont des molécules de faible poids moléculaire secrétées par de nombreux champignons et bactéries en réponse à la carence en fer (Pérez-Mirinda *et al.*, 2007). Ils solubilisent et transportent le fer vers la cellule microbienne à travers des récepteurs spécifiques (Cabrera *et al.*, 2001; Sridevi *et al.*, 2008). Les streptomycètes du sol sont capables de produire les sidérophores (Muller *et al.*, 1984). *Streptomyces fulvissimus* ATCC 27431 en accumule à un taux avoisinant à 94% (Bendale *et al.*, 2009).

I-4-3-4. Production d'antibiotiques

L'émergence des microbes multirésistants aux antibiotiques a créé le besoin d'orienter la recherche vers de nouvelles molécules antibiotiques. Les actinomycètes constituent en effet une solution, elles produisent approximativement 2/3 de ces biomolécules (Bulter *et al.*, 2002). De nombreuses actinobactéries du sol synthétisent des substances antimicrobiennes, celles-ci montrent un rôle antagoniste élevé. 75% et 60% des antibiotiques produits par les actinomycètes sont utilisés respectivement en médecine et en agriculture (Riedlinger *et al.*, 2006 ; Ben Ameer Mehdi *et al.*, 2006), les streptomycètes sont à l'origine de 75% des antibiotiques produits. Le genre *Streptomyces* est considéré en réalité l'une des sources majeures des produits naturels bioactifs (Pridham *et al.*, 1956 ;Stevenson, 1956 ; Subramani et Aabersgreg, 2012). Selon Llic *et al.* (2007), 60% des composés antifongiques et antibactériens et de phytohormones sont produits par *Streptomyces*. La néomycine et la streptomycine sont respectivement produites par *S. griseus* et *S. fradiae* (Szeszak et Szabo, 1967 ; Szabo *et al.*, 1985). D'autre part, *S. viridochromogenes* et *S. hygroscopus* synthétisent le tri-peptide phosphinothricine qui possède des propriétés bactéricides, fongicides et herbicides (Schwartz *et al.*, 2004). La staurosporine (*Streptomyces* sp. TP-A0274 et *Lechevalieria staurosporeus*) et la rébéccamycine (*L. aerocolonigenes* ATCC 39243) sont des antibiotiques anti-tumoraux (Onaka, 2006). *S. fungicidicus* produit l'enduracidine ayant une activité bactéricide considérable contre les streptocoques multi-résistants et les bactéries à Gram positif. D'un autre côté, *S. rochei* sbsp. *volubilis*, T-2636 accumule la sédécamycine qui inhibe fortement la croissance de *Staphylococcus aureus* (Higashide, 1995). La kalafungine de *S. tanashiensis* Kala UC-5063 possède une action antifongique et antibactérienne, comme elle agit sur les levures et les protozoaires (Johnson et Dietz, 1968). L'érythromycine, la sporaricine, la destomycine, la vanomycine et la saccharomycine sont synthétisés par le genre *Saccharopolyspora* (Suzuki, 1993).

En outre, *Nocardiopsis* sp. VITSVK 5(FJ973467) a une activité antifongique contre *Aspergillus fumigatus*, *A. flavus* et *A. niger* par comparaison à l'amphotéricine-B. De plus, il est actif vis-à-vis *Candida cruzi*, *C. tropicalis* et *C. albicans* par comparaison à la streptomycine (Vimal *et al.*, 2009).

Des actinomycètes rares: *Saccharopolyspora*, *Blastococcus* et *Actinocoralila* isolées à partir de nombreuses plantes médicinales sont douées de potentielle activité

antimicrobienne (Sheng *et al.*, 2013). Deux nouveaux analogues de la novobiocine sont produits par *Streptomyces* à partir d'*Aucuba japonica* et des cédarmycines par *Streptomyces* sp. à partir de *Cryptomeria japonica*. Le fistupyrone synthétisé par *Streptomyces* sp. isolé à partir d'*Allium fistulosum* inhibe sensiblement l'infection par *Alternaria brassicicola* (Igarashi, 2004).

I-4-3-5. Solubilisation du phosphore

Le phosphore est considéré comme l'un des éléments essentiels limitant la production agricole, sa teneur dans le sol est estimée à 400-1200 mg/Kg (Fernandez et Novo, 1988). Il est présent sous forme de composés métalliques liés au fer, à l'aluminium, ou au silicium dans les sols acides ou avec le carbonate de calcium dans les sols alcalins (Whitelaw, 2000). Afin de compenser cette pauvreté naturelle en phosphore, ce dernier est ajouté au sol sous formes de fertilisants phosphorés dont seulement 1% est utilisé par les plantes, le reste est rapidement converti en composés insolubles tels que les phosphates calcique et ferrique. Pour cette raison, les microorganismes solubilisant le phosphore ont un intérêt particulier (Yadav *et al.*, 2011), les bactéries et les levures sont les plus performants (Sahu *et al.*, 2007). Parmi les bactéries possédant cette activité, les actinomycètes occupent une place de choix (Jiang *et al.*, 2005). Les mines marocaines, par exemple, sont riches en phosphore et constituent alors de bons sites pour l'isolement de ces bactéries (Hamdali *et al.*, 2008a). *Micromonospora aurantica* et *S.griseus* (Hamdali *et al.*, 2008b) et *S. lividans* (Hamdali *et al.*, 2010) isolés à partir des mines marocaines solubilisent efficacement le phosphore et améliorent sensiblement le poids frais des tiges et des racines (Hamdali *et al.*, 2008b). Certaines actinomycètes possèdent une capacité importante de produire des phosphatases alcalines (Ghorbani-Nasrabadi *et al.*, 2013). *Micromonospora endolithica* par exemple, solubilise des quantités importantes de phosphore et produit des phosphatases alcalines et acides, à ceci s'ajoute sa capacité de coloniser *Phaseolus vulgaris* L. (El-Tarabily *et al.*, 2008).

I-4-3-6. Dégradation de la lignine

La lignine est un complexe biopolymérique résistant à la dégradation microbienne, cependant quelques espèces de champignons et bactéries dont les actinomycètes sont capables de la dégrader (Antai et Crawford, 1981, Hasegawa *et al.*, 2006). Certains composés polymériques aromatiques ligneux sont catabolisés par *Streptomyces setonii* 75Vi2, *S. sioyaensis* P5 et *S. viridosporus* T7A (Pometto et Crawford, 1985). Une

potentielle importance de ce groupe microbien intéresse de nombreux chercheurs pour son aptitude de dégrader la lignine en composés phénoliques très utiles (Petthey et Crawford, 1984).

I-4-3-7. Autres intérêts

Certaines espèces actinomycétales peuvent dégrader l'acide salicylique (AS) produit par les plantes et les bactéries. Ce dernier et son dérivé, l'acide acétyle salicylique (aspirine) sont largement utilisés comme des médicaments (Ishiyama *et al.*, 2004).

De nombreuses espèces de *Streptomyces* dégradent la phénylalanine et la tyrosine (Pometto et Crawford, 1985). De même *Nocardia* convertit l'acide benzoïque en catéchol (Sutherland *et al.*, 1981). Les actinomycètes présentent un intérêt crucial dans la biodégradation des produits plastiques (Pometto *et al.*, 1992). Les phénols considérés comme toxiques pour l'environnement marin sont dégradés par diverses souches actinomycétales (Winter *et al.*, 1991). *Streptomyces hygroscopus* produit l'acide pétridique qui stimule le développement des racines des haricots et dont le rôle semble équivalent à celui de l'acide indole acétique (Igarashi, 2004). L'acide hydroxycitrique (AHC) utilisé comme un additif alimentaire est le principal acide accumulé par de nombreuses plantes tropicales telles que, *Garcinia cambogia* et *Hibiscus subdariffa*. Du fait que son extraction est coûteuse, l'application des agents microbiens producteurs de cet acide a fait l'objet de nombreuses recherches, *Streptomyces* sp.U121 est capable de produire le AHC à des taux élevés (Yamada *et al.*, 2007).

Un nouveau polysaccharide synthétisé par *Streptomyces virginia* H03 est doué de potentielles activités antibactériennes vis-à-vis de *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* et *Candida utilis* contaminant les aliments (He *et al.*, 2010).

Enfin, le mycostope est un produit commercial synthétisé par *Streptomyces griseovirdis* K61 et *Streptomyces lydicus* WYEC 108, il est utilisé dans le traitement des maladies causées par *Phytium* sp. *Fusarium* sp. *Rhizoctonia* sp. et *Phytophthora* sp. (Rugthaworn *et al.*, 2007).

Les bactéries et les plantes face au stress salin

I- Les Bactéries face au stress salin

I-1. Caractéristiques des sols salés

La salinisation des sols est un problème environnemental qui limite largement la productivité et les rendements agricoles. La plupart des surfaces terrestres au tour du monde occupe environ $13.2 \cdot 10^9$ hectares, pas plus de $7 \cdot 10^9$ hectares sont potentiellement cultivables et seulement $1.5 \cdot 10^9$ hectares sont vraiment cultivés. Sur les $1.5 \cdot 10^9$ hectares, environ $0.34 \cdot 10^9$ hectares (23%) sont salés (Yang *et al.*, 2007). Les écosystèmes salés sont caractérisés par une faible irrégularité des précipitations associées à une importante évaporation favorisant l'accumulation des sels dans le sol. L'Algérie se situe parmi les pays touchés, presque 3.2 millions d'hectares de sa surface sont considérés comme salins (Hamdy, 1999).

I-2. Effet de la salinité sur la croissance bactérienne

L'augmentation des concentrations externes en sel pose un problème sérieux pour toutes les cellules vivantes dû à la perméabilité des membranes provoquant ainsi une perte d'eau suite à l'augmentation des teneurs en sel et ceci, se terminera par la mort des cellules (Saum et Müller, 2007). Les effets du stress salin sur l'activité microbienne dans un sol donné sont complexes et imprévisibles du fait des interactions possibles entre les ions, les bactéries et les particules du sol. De façon générale, les taux élevés de salinité inhibent la croissance de nombreuses bactéries du sol (Polonenko *et al.*, 1986). Une corrélation négative existe entre le nombre de la flore microbienne et la concentration des sels solubles (Ragab, 1993).

Selon Moradi *et al.* (2011), la salinité du sol est considérée un facteur de stress réduisant la diversité des microbes en affectant leurs fonctions et leurs activités. Le NaCl affecte considérablement la croissance des microorganismes. Les populations fongiques, bactériennes (et actinomycétales) diminuent significativement en présence de 5% de NaCl (P/P). (Omar *et al.*, 1994).

En présence de concentrations élevées de NaCl, la synthèse des enzymes, des ribosomes, des protéines (Kushner *et al.*, 1983) et également celle des antibiotiques est inhibée (Ng *et al.*, 2014). L'activité des nitrogénases, l'infection mycorhizale ainsi que la nitrification diminuent à des taux variant de 50%-70% (Nelson et Mele, 2007). Le NaCl

peut limiter la symbiose par la réduction de la prolifération et la survie de *Rhizobium* sp., par exemple en ralentissant les processus de colonisation bactérienne et par le mauvais fonctionnement des nodules au niveau des racines (Singleton *et al.*, 1982).

I-3. Stratégies d'osmoadaptation

Il existe deux différentes stratégies utilisées par les microorganismes halophiles afin de balancer la pression osmotique du cytoplasme avec celle du milieu externe. La première consiste à l'accumulation du potassium et du chlore. Cette stratégie exige une adaptation extensive de la machinerie enzymatique intracellulaire au sel, de plus, les protéines doivent maintenir leurs propres conformations et activités. Pour la plupart des groupes halophiles, cette stratégie n'est pas largement utilisée. Les halobacteriaceae, tels que, *Halobacterium salinarum* et *Haloarcula marismortui* sont très connus pour leur adaptation au stress salin par l'accumulation de teneurs élevées en potassium et en chlore (da Costa *et al.*, 1998). La deuxième stratégie, plus répandue, consiste en l'accumulation de solutés organiques afin de contrôler les activités hydriques internes, de maintenir le volume cellulaire approprié et de protéger les macromolécules intracellulaires des microorganismes soumis aux conditions salines. Les solutés compatibles sont encore nommés « osmolytes », ils sont généralement de faible poids moléculaire accumulés en teneurs élevées avec l'avantage d'être « compatibles » avec le métabolisme cellulaire (da Costa *et al.*, 1998 ; Lamosa *et al.*, 1998). Les osmolytes n'entraînent pas des effets adverses sur la composition et les processus cellulaires tels que la structure et la solubilité des protéines et les interactions entre les enzymes et les substrats et celles exercées entre les protéines et les acides nucléiques (Malin et Lapidot, 1996). Les « solutés compatibles » les plus largement accumulés par les microorganismes sont des sucres (tréhalose), des polyols (glycérol), des imino-acides (ectoïne), des acides aminés (glutamate et proline) et des bétaines (glycine bétaine) (Gouffi *et al.*, 1998).

I-3-1. Le tréhalose

Le tréhalose est un disaccharide non réducteur, accumulé par de nombreuses espèces bactériennes, fongiques et végétales dans des conditions de stress hydrique et salin (Iturriaga *et al.*, 2009). Des quantités élevées en tréhalose sont souvent détectées au niveau des spores, c'est un sucre généralement synthétisé en cas de dormance puisqu'il fournit l'énergie et confère également une tolérance vis-à-vis la congélation et la dessiccation (da Costa *et al.*, 1998). Il est considéré comme l'osmoprotecteur majeur chez *Rhodobacter*

sphaeroides f. sp. *denitrificans* IL106 cultivé en présence de sel (Xu *et al.*, 1998). Il est également détecté chez de nombreuses espèces de *Pseudomonas*, de *Rhizobium* et de *Azospirillum* (Miller et Wood, 1996).

I-3-2. Le glycérol et l'éctoïne

Le glycérol est accumulé chez certaines levures (*Debaromyces hansenii*) et de nombreuses algues (*Dunallila*) face au stress salin (Le Rudulier, 1993). Il est considéré comme l'osmolyte majeur chez *Pseudomonas mendocina* et *P. pseudoalcaligenes* (Miller et Wood, 1996). L'éctoïne a été découverte pour la première fois chez les bactéries halophiles et halotolérantes du genre *Ectothiorhodospira* (Galinski, 1995). Elle est synthétisée par de nombreuses bactéries hétérotrophes et est récemment identifiée comme l'osmolyte majeur des bactéries méthanotrophes et méthylotrophes halophiles (Trotsenko et Khmelenina, 2002). Certaines espèces halophiles de *Pseudomonas* (*P. halosaccharolytica* et *P. halophila*) sont aussi connues par leur pouvoir de synthétiser l'éctoïne comme un soluté compatible dans des conditions de stress salin (Miller et Wood, 1996).

I-3-3. La proline et le glutamate

Les concentrations de certains acides aminés, plus particulièrement la proline et le glutamate augmentent chez les bactéries non-halophiles et halotolérantes dans des conditions de stress osmotique (Imhoff et Rodriguez-Valera, 1984). Le NaCl entraîne chez *Halobacillus halophilus* (bactérie halophile modérée) une accumulation de la proline à des taux élevés (Saum et Müller, 2007). Dans des conditions de stress salin, les teneurs intracellulaires de cet osmolyte sont considérables chez *E. coli* et *S. typhimurium* (Lucht et Bremer, 1994). *Streptomyces griseus* et *S. californicus* synthétisent la proline en réponse aux effets délétères du NaCl afin de réguler leur pression osmotique (Killham et Firestone, 1984a). Dans des conditions de stress salin, l'approvisionnement de cet osmolyte améliore la croissance de *S. griseus* et de nombreuses autres espèces (Killham et Firestone, 1984b).

Le glutamate peut constituer plus de 90% des acides aminés accumulés chez de nombreux organismes exposés aux fortes teneurs de NaCl. Il permet de contre-balancer les charges positives des ions K^+ (Csonka, 1989). La synthèse du glutamate par *Rhizobium* sp. WR 1001 est déclenchée quand les cellules sont cultivées en présence d'osmolarités élevées (Hua *et al.* 1982). Il est retrouvé chez de nombreuses espèces de *Pseudomonas* et

de *Azospirillum*, il est aussi l'acide aminé prédominant chez *Azospirillum brasilense* cultivé dans de telles conditions (Miller et Wood, 1996).

I-3-4. La glycine bétaine

La glycine bétaine (GB) ou bétaine est considérée comme étant le soluté compatible le plus performant chez de nombreux microorganismes soumis à un stress osmotique : bactéries mésophiles et archéa (Galinski, 1995), algues marines, phytoplanctons et cyanobactéries (Cosquer *et al.*, 1999). Pour la plupart des microorganismes, elle est puisée à partir de milieu de culture (Le Rudulier, 1993 ; Galinski, 1995). La GB est très hygroscopique et soluble dans l'eau d'où son rôle dans la rétention de l'eau, elle agit à des concentrations inférieures à 1mM et restaure ainsi la croissance cellulaire (Le Rudulier et Bouillard, 1983). La production de la GB à partir des sources de carbone simples est typique chez les bactéries phototrophes halophiles et halotolérantes mais elle est rare chez les hétérotrophes (Nyyossölä *et al.*, 2001). Elle stimule la respiration des bactéries halophiles modérées en présence de fortes teneurs de NaCl (Landfald et Strøm, 1986). *Listeria monocytogenes* (Ko *et al.*, 1994) et *Ectothiorhodospira halochloris*, bactérie phototrophe halophile, par exemple accumulent la GB en réponse au stress osmotique (Imhoff et Rodriguez-Valera, 1984). Elle est considérée l'osmoprotecteur de choix chez *Escherichia coli*, elle augmente la tolérance aux sucres, aux sels et aux acides organiques (Miller et Ingram, 2007). En milieu minimum additionné de 0.15-0.5M de NaCl, la G.B stimule potentiellement la croissance de *E. coli* (von Weymarn *et al.*, 2001). De nombreuses espèces bactériennes synthétisent la G.B par l'oxydation de choline, celle-ci est le constituant commun des membranes des eucaryotes, elle est présente sous forme de phosphatidylcholine (Boncompagni *et al.*, 1999). *Azospirillum halopraeferens* (Hartmann *et al.*, 1991), *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Rhizobium meliloti* et *Vibrio costicola* peuvent convertir la choline en glycine bétaine lorsqu'ils sont soumis à un stress salin (Landfald et Strøm, 1986 ; Kienne, 1998).

II- Effet de la salinité sur les plantes

La salinité est un stress abiotique complexe qui affecte directement la croissance des plantes (Al-Mansouri *et al.*, 1988). Celles-ci sont classées en deux groupes, les glycophytes et les halophytes selon leurs capacités à survivre dans des conditions salines. Le développement des glycophytes est négativement affecté par le sel tandis que les halophytes tolèrent des concentrations élevées en NaCl (Banu Doganlar *et al.*, 2010). Les plantes répondent à la salinité en deux phases : dans la première, le potentiel hydrique externe diminue suite à la présence de sel au niveau des racines, la seconde phase inclut la sénescence de la feuille conséquence de l'accumulation des ions à ce niveau là (Munns, 2002). Le NaCl à fortes teneurs affecte la croissance, le métabolisme et la disponibilité des nutriments qui inhibe à son tour la photosynthèse par la dégradation des pigments; chlorophylles a et b (Ayala-Astorga et Alcaraz-Meléndez, 2010). Le tableau ci-dessous expose les principaux effets du stress salin sur quelques plantes (Sobhanian *et al.*, 2011).

Tab.6 : Effets du stress salin sur quelques plantes d'intérêt alimentaire

(Sobhanian *et al.*, 2011).

Riz	Photosynthèse, glycolyse, biosynthèse de l'ATP, enzymes antioxydantes.
Blé	Photosynthèse, biosynthèse de l'ATP, enzymes antioxydantes.
Pommes de terre	Photosynthèse, synthèse des protéines, biosynthèse de l'ATP.
Graines de soja	Photosynthèse, synthèse des protéines.

II-1. Diminution de la germination

L'un des effets délétères du stress salin est la diminution du taux de germination et l'inhibition de la croissance, ce qui affecte le poids de la matière sèche (El-Tayeb, 2006). Les concentrations élevées en sel réduisent le potentiel hydrique, il en résulte ainsi une diminution de l'absorption de l'eau par les graines (Jamil *et al.*, 2006). Le NaCl à 100mM par exemple, réduit la germination des graines de trois espèces de *Vigna unguiculata* L. : (*Pitiuba*, 6.1%), (*Espace 10*, 10.7%) et (*Canapus*, 25%) (Dantas *et al.*, 2005)

II-2. Diminution de l'absorption de l'eau et la disponibilité en nutriments

Dans des conditions salines, de fortes teneurs en Na^+ , Ca^{+2} , Mg^{+2} , Cl^- et en sulfates dans le milieu réduisent la disponibilité en éléments nutritifs, inhibent le transport et saturent les sites de fixation des ions. La compétition et les interactions entre le Cl^- et les nitrates, le Na^+ et le Ca^{+2} et le Na^+ et le K^+ conduisent à un déséquilibre ionique, une déficience en nutriments et/ou une toxicité ionique (Grieve et Shannon, 1999). Le NaCl affecte la croissance des plantes par l'accumulation des ions à des niveaux toxiques ce qui conduit à la diminution de la disponibilité en eau et en nutriments (Ashraf et McNeilly, 2004). L'accumulation du NaCl au niveau de la rhizosphère réduit le potentiel hydrique du sol ainsi que l'absorption de l'eau conduisant à la déshydratation de la cellule. L'augmentation des quantités de Na^+ et de Cl^- dans le sol affecte la disponibilité des nutriments indispensables par la compétition entre les ions et par la modification de la sélectivité des membranes. Les ions Na^+ atténuent l'influx intracellulaire des ions K^+ et l'acquisition de cet élément essentiel par les cellules (Lloyd *et al.*, 1989) ; le potassium joue en effet un rôle important dans la croissance normale et la reproduction des plantes. Il est aussi impliqué dans l'activation des enzymes, la synthèse des protéines et l'ajustement osmotique. La salinité (dominée par les ions Na^+) réduit également la disponibilité des ions Ca^{+2} ce qui affecte la structure et la composition des organes végétatifs et reproductifs (Tounekti *et al.*, 2011). Selon Tunçtürk *et al.* (2011), chez *Brassica napus* L., soumise à des conditions salines, les teneurs intracellulaires en Na^+ et en Cl^- au niveau des tiges, des racines et des feuilles augmentent tandis que celles des ions Ca^{+2} et K^+ diminuent.

II-3. Génération des espèces oxygénées réactives (EOR)

Des teneurs excessives de NaCl provoquent un déséquilibre ionique et un stress hyperosmotique chez les plantes. Ceci induit un deuxième type de stress; l'endommagement ou le stress oxydatif (Tunçtürk *et al.*, 2011). Le stress salin provoque la génération des (EOR) au niveau des chloroplastes causant l'oxydation des lipides, la dégradation des protéines, l'inactivation des enzymes et la perméabilité des membranes (El-Tayeb, 2006). Parmi les EOR (le H_2O_2 , le superoxyde d'hydrogène et son dérivé toxique le radical hydroxyle), seul le H_2O_2 est relativement stable et capable de pénétrer au niveau de la membrane plasmique. A côté de son effet toxique au niveau des chloroplastes, le H_2O_2 est un inhibiteur puissant du cycle de Calvin (Gadalla, 2009). La salinité réduit également les taux de l'ARN et de l'ADN, l'inhibition des réactions métaboliques ARN-

protéines conduit à la diminution de la surface foliaire chez *Phaseolus vulgaris* en présence de concentrations élevées de NaCl (Banu Doganlar *et al.*, 2010).

II-4. Inhibition de la photosynthèse

La photosynthèse est considérée comme la première source de la production de la matière sèche chez les plantes. La sénescence précoce des feuilles réduit considérablement le rendement agricole (Gadalla, 2009). L'un des facteurs inhibant fortement la photosynthèse est la salinité, ceci est la conséquence de la fermeture des stomates, ce qui réduit la transpiration et empêche l'absorption de l'eau dans les différents tissus de la plante (El-Kaoua *et al.*, 2006). L'accumulation d'ions toxiques, la réduction des nutriments, la génération des espèces oxygénées réactives, la peroxydation des lipides et la perméabilité des membranes provoquent tous la sénescence des feuilles (Leidi *et al.*, 1991). La photosynthèse est significativement affectée par l'excès d'ions Na⁺ conduisant à la diminution du contenu en chlorophylle et à l'endommagement de la structure des chloroplastes. La réduction des taux de chlorophylle est le résultat de la peroxydation des lipides des membranes des chloroplastes ou à la formation des hydro-péroxydes des acides gras. De plus, la salinité augmente l'activité des chlorophyllases et interfèrent avec la *de-novo* synthèse des protéines reliant les pigments chlorophylliens (Jaleel *et al.*, 2007). La synthèse de chlorophylle dépend de la nutrition minérale, celle-ci affecte significativement les dynamiques de la formation des feuilles. Puisque le NaCl réduit la disponibilité de la nutrition minérale, il en résulte une diminution de teneurs en chlorophylle (Bojovic et Stojanovic, 2005). Chez *Zea mays* et *Carthamus tinctorius*, les taux des chlorophylles a et b diminuent en présence de concentrations excessives de NaCl (Banu Doganlar *et al.*, 2010).

III- Halotolérance des plantes

Face au stress salin, les plantes accumulent des solutés compatibles dans le cytosol et les autres organes, leur rôle consiste à l'osmoprotection des cellules et à l'ajustement osmotique. Ils sont essentiellement des acides organiques, des acides aminés et des sucres, certains constituants inorganiques peuvent être impliqués (Mandhania *et al.*, 2010). Ces solutés compatibles protègent les enzymes et les membranes vis-à-vis les effets délétères du NaCl (Rhodes et Hanson, 1993).

III-1. La glycine bétaine

La glycine bétaine est accumulée au niveau des feuilles des cellules végétales (McDonnell et Wyn Jones, 1988) et des chloroplastes des halophytes comme un osmoprotecteur dans des conditions de stress environnemental. Les plantes supérieures synthétisent la GB à partir de choline dans deux réactions enzymatiques catalysées par la choline monooxygénase et la bétaine aldéhyde déshydrogénase. Les cellules de blé accumulent les bétaines seulement à partir de l'hydrolyse de la phosphatidylcholine (Yokoi *et al.*, 2002). La G.B participe à la stabilisation des réactions de la photosynthèse, la structure des protéines extrinsèques du complexe PSII, l'activation des enzymes et la synthèse de l'ATP (Mäkelä *et al.*, 1996).

III-2. La proline

L'accumulation endogène de proline chez les plantes soumises à un stress salin est utilisée comme un indicateur de l'halotolérance (Cha-Um et Kirdmanee, 2009). Son accumulation constitue un bon paramètre pour évaluer l'effet de la salinité. Les teneurs en proline augmentent chez le blé soumis à un stress salin en présence de 0, 4000, 8000 et 12000 ppm de NaCl, elles sont respectivement de 0.54, 1.31, 2.56 et 3.85 $\mu\text{moles/g}$ de matière fraîche (Abdel-Hady *et al.* 2001). Chez les cellules du maïs par exemple, elle est accumulée à un taux de 600 $\mu\text{moles/g}$ de matière fraîche en présence de 400mM de NaCl. Une accumulation significative de la proline est observée chez le palmier dattier en augmentant les concentrations de NaCl (0-225mM) (Al-Khayri, 2002). Le rôle de la proline dans l'ajustement osmotique, la stabilisation des protéines et la détoxification des cellules vis-à-vis les ions toxiques est largement établi. (Cha-Um et Kirdmanee, 2009). L'accumulation de la proline chez le riz accroît la biomasse racinaire et le développement des fleurs soumis à un stress salin (Datta, 2002). Chez *Triticum durum* L., une corrélation

positive existe entre l'accumulation la proline et la stabilité des membranes (El-Koua *et al.*, 2006).

III-3. Les sucres

Dans des conditions de stress salin, les sucres totaux intracellulaires interviennent dans l'ajustement osmotique chez certaines plantes. La salinité provoque une accumulation importante des teneurs en sucres chez *Chenopodium quinoa* qui pourraient agir comme osmoprotecteurs (Prado *et al.*, 2000). L'augmentation des teneurs du tréhalose, du saccharose et du mannitol a été observée suite à l'apport de NaCl au stade des semi-graines (Carvajal *et al.*, 1998). Le tréhalose, par exemple, stabilise efficacement les enzymes déshydratées et les lipides membranaires des plantes (Datta, 2002).

III-4. Les caroténoïdes

Le stress salin provoque une diminution des taux de caroténoïdes chez les espèces non ou moyennement halotolérantes. Toutefois, chez celles tolérantes au sel, la diminution est moins prononcée. En revanche, en présence de 50mM de NaCl, les taux de caroténoïdes augmentent dans les feuilles de *Brassica juncea* par rapport au témoin (Mandhania *et al.*, 2010). Les caroténoïdes participent dans la protection des centres des réactions PSII contre l'endommagement cellulaire conduisant à la photoinhibition. Ils sont considérés comme des antioxydants, ayant un potentiel effet dans la détoxification des plantes des effets délétères des espèces oxygénées réactives (El-Kaoua *et al.*, 2006).

Les halophytes et l'osmorégulation

I- Les halophytes et le stress salin

Les halophytes sont des plantes pouvant survivre dans des environnements où la concentration du NaCl dépasse 200mM. Elles constituent environ 1% de la flore végétale mondiale et peuvent avoir divers intérêts économiques, certaines constituent une source d'amidon, de sucres et de protéines -*Suaeda* sp. *Salicornia* sp. *Acacia* sp...etc- (Zhao *et al.*, 2011).

I-1. Classification

Les halophytes sont classées en trois grandes familles (Tab. 7) (Le Houérou, 1993), elles se développent à des concentrations élevées en NaCl et absorbent l'eau à partir du sol ayant un potentiel hydrique faible (Khan *et al.*, 2000). Selon les mécanismes d'accumulation des sels, Breckl, 1995 a divisé les halophytes en trois catégories : celles sécrétant les sels, les succulentes et les halophytes résistantes au sel (les pseudo-halophytes).

Tab. 7 : Les différentes classes d'halophytes.

Classes d'halophytes	Concentrations salines tolérées	Genres représentants
Hypohalophytes	40 à 100mM	-
Euhalophytes	100 à 500mM	<i>Atriplex</i> sp., <i>Tanarix.</i> , <i>Maireana</i> sp.
Hyperhalophytes	Dépassent celle de l'eau de mer	<i>Halocnemum</i> sp., <i>Strobilaceum</i> sp., <i>halosarcia</i> sp., <i>Salicornia</i> sp., <i>Suaeda</i> sp., <i>Salsola</i> sp. et <i>Atriplex</i> sp.

I-2. Stratégies d'osmoadaptation

A la différence des glycophytes qui ne supportent pas la présence de sels, les halophytes se développent mieux sur sol salé. Elles déclenchent des mécanismes de tolérance contribuant à l'adaptation au stress osmotique et ionique provoqué par la salinité élevée. Ces mécanismes permettent d'ajuster la pression osmotique interne grâce aux électrolytes et aux solutés organiques, principalement des sucres solubles et des acides

aminés (proline). La glycine bétaine est également synthétisée par de nombreuses halophytes (Driouich *et al.*, 2001; Denden *et al.*, 2005). La proline et la glycine bétaine augmentent la tolérance en présence de teneurs excessives de NaCl et agissent comme osmoprotecteurs des protéines (Schobert, 1977). Afin de maintenir la turgescence cellulaire, les ions Na⁺ et Cl⁻ devraient être concentrées dans les vacuoles des halophytes et la différence du potentiel hydrique entre le cytoplasme et les vacuoles serait maintenue par la synthèse de solutés organiques- proline et glycine bétaine- (Matoh *et al.*, 1987).

I-2-1. Accumulation des ions Na⁺ et K⁺

Les halophytes élaborent de nombreux mécanismes afin de diminuer les taux excessifs en ions Na⁺ dans le cytoplasme, ceci implique la réduction de l'influx du sodium et l'augmentation de son efflux à travers les systèmes de transport Na⁺/H⁺ au niveau de la membrane plasmique. La compartimentation des ions Na⁺ au niveau des vacuoles exerce également un effet minimisant des concentrations des ions Na⁺ dans le cytosol (Apse *et al.*, 1999). Selon Khan *et al.* (2000), *Atriplex griffithii* accumule des quantités très importantes en ions (40% du poids sec) afin de survivre dans des habitats hypersalés. Ce mécanisme d'osmoadaptation est plus avantageux par rapport à la synthèse des solutés compatibles (proline, G.B) : **1-** les ions inorganiques sont facilement absorbés, **2-** l'assimilation des ions protège les photosynthétases impliquées dans la structure du squelette carbonée (Yassine et Al-Thani, 2007). Dans des conditions salines, des teneurs considérables de Na⁺ sont retrouvées au niveau des vacuoles de *Atriplex gmelini* afin de surmonter les effets toxiques du NaCl (Matoh *et al.*, 1987). Chez *Atriplex* sp. les ions K⁺ et Na⁺ sont accumulés respectivement en réponse à la faible activité hydrique et la présence de fortes osmolarités (Yang *et al.*, 2007).

I-2-2. La proline

L'accumulation de la proline chez les halophytes conduit à la diminution de la production des espèces oxygénées réactives (EOR) (Jithesh *et al.*, 2006). La proline intervient dans la régulation du pH cytoplasmique et constitue une source de carbone et d'azote durant les périodes de stress (Denden *et al.*, 2005). L'accumulation de la proline est observée chez *Sesuvium portulacastrum* dans des conditions de déficit hydrique et chez *Atriplex halimus* en présence de sel. Chez *Atriplex halimus* L. cet osmolyte se concentre dans le sens racines, tiges et feuilles à des teneurs significativement élevées lorsque la salinité du milieu extérieur augmente (Djerroudi-Zidane *et al.*, 2010). Des teneurs faibles

en proline sont observées au niveau des graines de *Kosteletzkya virginica* soumises à un stress salin. Cependant, lorsque les graines germent, le contenu de cet osmolyte augmente considérablement Poljakoff-Mayber *et al.* (1994). Des concentrations faibles en proline protègent efficacement les graines de nombreuses halophytes ; *Halogeton glomeratus*, *Salicornia utahensis* et *Triglochin maritima* (Gul *et al.*, 2000) contre les effets toxiques du NaCl (Poljakoff-Mayber *et al.*, 1994). Chez *Kochia sieversiana*, soumise à un stress salin, le taux d'accumulation de la proline est 13 fois plus par comparaison au témoin (Yang *et al.*, 2007).

I-2-3. La glycine bétaine

La glycine bétaine joue un rôle fondamental dans la protection du système photosynthétique par la stabilisation du système PSII et les protéines extrinsèques durant le stress salin. (Ben Hassine *et al.*, 2008). Ce soluté protège efficacement les membranes thylakoïdiennes de *Suaeda maritima* et permet par ce biais la maintenance de la machinerie photosynthétique (Genard *et al.*, 1991). Des teneurs importantes en GB sont observées chez de nombreuses Chenopodiaceae : *Salsola*, *Sarcocornia* sp. *Atriplex* sp. *Halosarcina* sp...etc (Rhodes et Hanson, 1993). La GB est considérée comme le soluté compatible majeur accumulé en réponse au stress salin chez *Kochia sieversiana* (Yang *et al.*, 2007). Les feuilles de *Atriplex griffithii* concentrent des quantités considérables en GB dans des milieux de fortes osmolarités (Khan *et al.*, 2000). De nombreuses espèces de *Limonium*, *L. sinuatum*, *L. perezii* et *L. vulgare* synthétisent des taux élevés de GB dans leurs habitats hypersalés (Hanson *et al.*, 1991).

I-2-4. Les sucres solubles

Les sucres sont des osmolytes fréquemment retrouvés chez les plantes exposées à un stress salin. (Ruffino *et al.*, 2010). Une augmentation du contenu en sucres solubles principalement le saccharose est associée à l'adaptation des halophytes aux conditions salines (Prado *et al.*, 2000). L'accumulation du saccharose et du glucose est observée chez plusieurs espèces soumises à des concentrations élevées de NaCl. Chez *Chenopodium quinoa* par exemple, les teneurs en sucres totaux, en saccharose et en glucose sont respectivement de 265, 75, et 107 $\mu\text{moles/g}$ poids sec (Ruffino *et al.*, 2010).

**MATERIEL ET
METHODES**

L'effet de diverses concentrations en NaCl sur des souches d'actinomycètes est étudié tout en observant l'effet de l'apport exogène de molécules synthétiques osmoprotectrices (la glycine bêtaïne, la proline et le tréhalose). D'autre part, l'osmoprotection naturelle est aussi analysée suite à l'apport d'extrait d'halophyte (*Salsola vermiculata*).

La production de substances antibactériennes, antifongiques et de l'acide indole acétique est également étudiée. Enfin, ce travail examinera l'effet du sel (0, 100 et 200 mM) sur la croissance du blé dur, *Triticum durum* L. (variété Mohamed Ben Bachir) et son éventuelle restauration par l'apport d'extrait de *Salsola vermiculata* et/ou de la souche actinomycétale tellurique isolée.

I- Isolement des actinomycètes du sol

I-1. Prélèvement du sol

Un échantillon de sol fertile est collecté pendant le mois de Mai (2010) à partir d'un champ de blé de la région d'El Ouricia (Nord de Sétif). Ce dernier est prélevé sur une profondeur de 10 cm tout en éliminant la couche superficielle.

I-2. Mesure de la salinité

Du sol finement broyé (2g) est repris dans 20ml d'eau distillée, la solution obtenue est agitée pendant 15min et laissée à décanter pendant 20 minutes. La conductivité électrique du surnageant est mesurée grâce à un salinomètre (Type HANA instruments HI9032) (Pansu *et al.*, 1998).

I-3. Isolement des actinomycètes

L'isolement bactérien est réalisé sur milieu amidon-caséine (g/l) additionné simultanément de griséofulvine (25µg/ml), de nystatine (10µg/ml) et de l'acide nalidixique (10µg/ml), le pH est ajusté à 7.2 et le milieu est stérilisé (120°C/20 min).

Amidon	10
Caséine	0.3
KNO ₃	2
NaCl	2
K ₂ HPO ₄	2
MgSO ₄ , 7H ₂ O	0.05
CaCO ₃	0.02
FeSO ₄ , 7H ₂ O	0.01
Agar	18
Eau distillée	qsp 1000ml

Un traitement thermique est appliqué à l'échantillon de sol (60°C pendant 60 min) afin d'empêcher le développement d'autres bactéries (Vijayakumar *et al.*, 2007). L'isolement bactérien est réalisé en mélangeant aseptiquement 1 g de sol finement broyé dans 10 ml d'eau distillée stérile (120°C/20min). Des dilutions décimales (10^{-1} à 10^{-4}) sont effectuées dans un tampon phosphate (pH =7.2). 100µl sont alors ensemencés sur milieu amidon-caséine. Après incubation (4 jours/30°C), les dénombrements bactériens et les examens microscopique et macroscopique sont réalisés.

I-4. Examens microscopique et macroscopique

Les examens microscopique et macroscopique permettent respectivement la détermination du Gram, l'aspect des cellules et la couleur des mycélia aérien et végétatif. Ils sont réalisés pour toutes les bactéries isolées. Cependant, seule la souche produisant des teneurs élevées en AIA et possédant des activités antibactériennes et antifongiques importantes serait identifiée.

I-5. Critères morphologiques d'identification

La systématique des actinomycètes est basée sur trois types de critères : morphologiques, physiologiques et chimiques. La morphologie est l'un des critères essentiels d'identification, elle précède l'étude chimique des constituants cellulaires. Les propriétés culturales et morphologiques sont déterminées par les méthodes décrites dans le "International *Streptomyces* Project" (ISP) (Shirling et Gottlieb, 1966).

I.S.P.2: (Pridham *et al.*, 1957): Extrait de levures, extrait de malt et agar.

I.S.P.3 : (Küster, 1959): Farine d'avoine et agar.

I.S.P.4 : (Küster, 1968): Amidon, sels minéraux et agar.

I.S.P.5 :(Pridham et Lyons, 1961) : Glycérol, asparagine et agar .

La couleur des mycélia aérien et végétatif est déterminée après une semaine d'incubation à 30°C.

II- Activités antibactérienne et antifongique et production de l'acide indole acétique

II-1. Activité antibactérienne des actinomycètes

Deux souches d'actinomycètes nous ont été aimablement fournies par le Professeur J. Selvin de l'université de Bharathidasan, Tiruchirappalli, (Inde). Il s'agit de *Streptomyces* sp. MADO2 et *Nocardiosis* sp. MADO3. Ces deux souches et celles isolées par nos soins ont constitué l'essentiel de notre étude (activité antibactérienne, activité antifongique, production d'acide indole acétique, effet de la salinité et d'osmoprotecteurs synthétiques et naturels sur la croissance bactérienne, etc...). L'activité antibactérienne est mise en évidence par la méthode des disques d'agar (Lemriss *et al.*, 2003) en utilisant le milieu GLM de la composition suivante :

Extrait de levure	5	
Extrait de malt	3	
Peptone	5	
Glucose	10	
Agar	20	
Eau distillée	qsp 1000ml	Le pH est ajusté à 7.2

Après incubation (7 jours/30°C), les colonies sont prélevées et disposées sur milieu Muller-Hinton, préalablement ensemencé par des souches de *Escherichia coli* ATCC 25922, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 et *Salmonella typhimurium*. Les cultures sont gardées à 4°C pendant 4 heures puis incubées (37°C/18-24 heures) (Lemriss *et al.*, 2003). Les diamètres d'inhibition (mm) sont mesurés pour chaque bactérie test vis-à-vis les bactéries isolées et les deux souches de référence (MADO2 et MADO3).

II-2. Activité antifongique des souches d'actinomycètes

L'activité antifongique des souches actinomycétales isolées et les deux souches de référence est déterminée par la méthode des disques d'agar. Les champignons- cibles testés sont : *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus* et *Penicillium citrinum*. L'activité est étudiée sur milieu PDA : 200 g de pomme de terre sont additionnés à 500 ml d'eau distillée, de l'infusion de pomme de terre est obtenue après chauffage du mélange. Celle-ci est ajoutée encore à 500 ml d'eau distillée, 15 g d'agar et 20 g de glucose. Les diamètres d'inhibition sont déterminés après 48 heures/ 28°C (Lemriss *et al.*, 2003).

II-3. Production d'acide indole acétique

Afin de déterminer la capacité des souches actinomycétales à produire l'acide indole acétique, un test de production de cette auxine est réalisé selon la méthode de Bano et Musarrat, (2003). Elles sont préalablement cultivées sur le milieu (YM) (g/l) :

Extrait de malt	3	
Extrait de levure	3	
Peptone	5	
Glucose	5	
Agar	18	
Eau distillée	qsp 1000ml	Le pH est ajusté à 7.2.

Après incubation (30°C/4 jours), des disques ($\varnothing=8-10$ mm) des colonies cultivées sont ensuite transférés dans 5 ml du milieu (YM) contenant 2 mg/ml de tryptophane. Ces cultures sont incubées à (30°C/4jours) sous agitation mécanique (125 rpm). Après centrifugation à 11000×g/15 min, 1 ml du surnageant est mélangé avec 2 ml du réactif de Salkowsky. La solution est vortexée et gardée à température ambiante pendant 20 min. L'apparition d'une couleur rose indique la production de l'AIA. Les concentrations de cette hormone sont déterminées par spectrophotométrie ($\lambda=530$ nm) contre une courbe d'étalonnage, les teneurs de l'AIA sont déterminées en $\mu\text{g/ml}$.

a- Préparation du réactif de Salkowsky

Le réactif est préparé en mélangeant 3 ml d'une solution de FeCl_3 (0.5 M) avec de l'eau distillée (50 ml). Après dissolution complète du chlorure ferrique, 60 ml de H_2SO_4 concentré (36 N) sont ajoutés soigneusement. Le mélange est laissé à refroidir, ensuite 50 ml d'eau distillée sont additionnés. Enfin, le réactif préparé est conservé et gardé à froid.

II-3-1. Etude des conditions optimales de la production de l'AIA

La souche actinomycétale la plus performante dans la production de l'AIA est alors testée pour établir les meilleures conditions de croissance et de production de cette auxine.

II-3-1-1. Effet du NaCl, du pH, de température et des concentrations du L-tryptophane

Le milieu (YM) additionné de 2 mg/ml a servi pour l'étude de l'influence du NaCl (100, 200, 300 et 500 mM), du pH (5, 6, 7, 8 et 9), de température (25, 30 et 37°C) sur la croissance et la production de l'AIA. Concernant l'effet des concentrations du L-tryptophane, les teneurs suivantes ont été utilisées (2, 5 et 7 mg/ml). Les cinétiques de croissance et de production de l'AIA sont suivies toutes les 24 heures (30 °C/7 jours).

III- Mise en évidence de l'halotolérance de *Streptomyces* sp. MADO2 et *Nocardiosis* sp. MADO3 et la souche SF5 isolée du sol

Le suivi de la croissance bactérienne est réalisé dans deux milieux différents de point de vue composition. Il s'agit du milieu minimum M63 et du milieu riche ISP5 (milieu glycérol-asparagine).

III-1. Préparation de l'inoculum

5 ml du milieu ISP2 sontensemencés à partir de cultures fraîches de *Streptomyces* sp. MADO2, de *Nocardiosis* sp. MADO3 et de SF5 après incubation (30°C/48 heures). Les suspensions bactériennes sont alors centrifugées (3000×g/15 min). Les culots sont alors lavés à raison de trois reprises dans 5 ml d'eau physiologique (NaCl : 9g/l). Des dilutions sont effectuées dans un tampon phosphate (pH=7.2) à partir d'une suspension bactérienne et 100 µl sont alors étalés sur le milieu ISP2. Après incubation, les dénombrements permettent de nous donner une idée sur le nombre de cellules bactériennes par 1 ml de milieu.

a- Composition du milieu ISP2 (g/l)

Extrait de levures	4
Extrait de malt	10
Glucose	10
Eau distillée	qsp 1000 ml

III-2. Milieux d'étude de l'halotolérance

L'effet du NaCl à diverses concentrations (0, 100, 500, 800 et 1000 mM) est étudié simultanément sur milieux M63 et ISP5. L'utilisation de milieux de composition distincte est importante pour mieux analyser l'effet de chaque milieu sur le comportement des bactéries testées vis-à-vis le NaCl.

III-2-1. Composition du milieu M63 (g/l)

KH ₂ PO ₄	13.6
(NH ₄) ₂ . SO ₄	2
MgSO ₄ . 7 H ₂ O	0.2
FeSO ₄ . 7 H ₂ O	0.0005
Glucose	1.8
Eau distillée	qsp 1000 ml

Le pH est ajusté à 7.2 et le milieu est stérilisé à 110°C pendant 30 min.

N. B

Le milieu M63 est généralement préconisé dans l'étude de l'halotolérance des Enterobacteriaceae. Son utilisation pour analyser l'effet du NaCl et d'osmoprotecteurs sur la croissance des actinomycètes est de notre initiative.

III-2-2. Composition du milieu glycérol asparagine (ISP5) (Shirling et Gottlieb, 1966)

L. asparagine	1
Glycérol	10
K ₂ HPO ₄	1
Solution saline standard	1 ml
Agar	20
Eau distillée	qsp 1000 ml

Le pH est ajusté à 7.2 et le milieu est stérilisé (120°C/ 20 min).

La solution saline standard est composée de :

FeSO ₄ . H ₂ O	0.1g
MnCl ₂ . 4H ₂ O	0.1 g
ZnSO ₄ . 7 H ₂ O	0.1 g
Eau distillée	100 ml

III-2-3- Milieux M63 et ISP5 additionnés de glycine bétaine (GB), de proline et de tréhalose

La GB, la proline et le tréhalose (1mM) sont ajoutés aux différents échantillons additionnés de NaCl (0, 100, 500, 800 et 1000 mM). Des solutions mères de ces molécules (100 mM) (Sigma) sont stérilisées par passage sur membrane Millipore (porosité = 0.22 µm) et ajoutées aux deux milieux à une concentration finale de 1mM. Après inoculation (1ml) de suspensions bactériennes de *Streptomyces* sp. MADO2, *Nocardopsis* sp. MADO3 et SF5, les échantillons sont incubés à 30°C sous agitation mécanique. La cinétique de croissance bactérienne des trois souches est déterminée chaque 24 heures pendant 9 jours par spectrophotométrie ($\lambda = 540$ nm) (Jignasha et Singh, 2007).

IV- Halotolérance de *Streptomyces* sp. MADO2 et de la souche actinomycétale isolée SF5 et l'osmoprotection apportée par l'halophyte *Salsola vermiculata*

IV-1. Présentation

Salsola vermiculata appartient à la famille des Chenopodiaceae. Cette halophyte est connue par son pouvoir d'accumuler des composés Dragebdroff-positifs (glycine bétaine). Les Chenopodiaceae accumulent non seulement la GB, mais également des ions (Ca^{+2} , K^+ et Mg^{+2}). Ces éléments jouent un rôle important dans l'ajustement osmotique (Yasseen et Abu-Al-Basal, 2010). *S. vermiculata* a été prélevée de la Sebkha de Ain Ouelmen (Ouled Chbel) au mois d'Octobre (2010).

IV-2. Milieux préparés à partir d'extraits aqueux de *S. vermiculata*

L'halophyte est rincée abondamment avec l'eau distillée, séchée à l'air libre et broyée finement. L'extrait aqueux est le résultat de la stérilisation de l'halophyte à 110°C pendant 30 min. la chaleur favorise le relargage des molécules osmoprotectrices. L'halophyte est utilisée à une teneur de 2% dans les milieux ISP5 et M63 additionnés de concentrations de NaCl (0, 100, 500, 800 et 100 mM).

IV-3. Estimation de la croissance bactérienne

L'halotolérance et l'osmoprotection apportée par l'extrait d'halophyte sont déterminées en inoculant les deux milieux avec 100 μl de suspension bactérienne de *Streptomyces* sp. MADO2 et la souche SF5 isolée. La croissance est déterminée après 4 jours d'incubation sous agitation mécanique (200 rpm). Les dénombrements bactériens permettent de nous donner une idée sur le nombre de cellules de *Streptomyces* sp, MADO2 et de la souche isolée SF5 (UFC/ml).

IV-4. Milieux préparés à partir d'extrait hydro-alcoolique de *S. vermiculata*

Salsola vermiculata est rincée avec l'eau distillée, séchée et broyée. 50 g sont additionnés à l'éthanol 70% (V/V) sous agitation à température ambiante. La solution est ensuite filtrée par du papier filtre tout en éliminant les particules indésirables. Le filtrat obtenu est passé au Rotavapor, une matière collante est récupérée et est mise dans 20 ml d'eau distillée. L'extrait hydro-alcoolique est stérilisé (110°C/30 min). Une concentration finale de 10^{-2} de l'extrait hydro-alcoolique est additionnée aux deux milieux de culture.

IV-5. Mise en évidence de la croissance de la souche actinomycétale SF5 isolée en présence d'extrait hydro-alcoolique de *S. vermiculata*

1 ml de l'extrait hydro-alcoolique de *S. vermiculata* est ajouté aux deux milieux de culture. 100µl ml de l'inoculum de chaque souche bactérienne sont additionnés aux différents échantillons salés (0, 100, 500, 800 et 1000 mM). Ces derniers sont ultérieurement incubés à 30°C sous agitation mécanique (200 rpm). La croissance est suivie chaque 24 heures par spectrophotométrie ($\lambda = 540$ nm) pendant 9 jours.

N.B :

Les effets de la glycine bêtaïne, de la proline, du tréhalose et de l'extrait hydro-alcoolique de l'halophyte en présence de NaCl sur la croissance bactérienne sont étudiés dans les mêmes conditions.

V- Effet de la souche actinomycétale SF5 et d'extrait aqueux d'halophyte sur la croissance du blé dur (*Triticum durum* L.)

Cette étude est menée sur une variété de blé dur nommée Mohamed Ben Bachir (MBB) qui est une sélection locale provenant d'ITGC de Sétif (Algérie) obtenue par le Centre National de Contrôle et de Certification des semences et des plantes. L'objectif consiste à étudier l'effet de NaCl, de la souche SF5 et d'extrait d'halophyte sur la germination et la croissance de *Triticum durum* L.

V-1. Germination des graines de blé

Du papier filtre, préalablement stérilisé à 180°C est mis dans des boîtes de Pétri stériles. Les graines de même taille stérilisées par l'hypochlorite de sodium pendant cinq minutes et rincées abondamment avec l'eau distillée sont placées dans des boîtes de Pétri (à raison de 20 graines par boîte) (Shahba *et al.*, 2010). Elles sont immergées quotidiennement par 3ml de solutions salées (0, 100 et 200 mM) additionnées ou non d'extraits aqueux d'halophyte (*Salsola vermiculata*) et/ou de la souche d'actinomycète SF5. Les témoins sans sel sont imbibés avec de l'eau distillée. L'étude comporte douze échantillons ou traitements menés en 3 répétitions (Tab.8). L'incubation a lieu à 20°C dans des conditions lumière/obscurité naturelles pendant 15 jours.

V- 2. Préparation d'extrait aqueux d'halophyte

L'halophyte fraîche est rincée par l'eau distillée, séchée et broyée. Elle est ensuite stérilisée à 110°C pendant 30 min pour être utilisée à raison de 2% dans les solutions témoins et salées (NaCl/100 et 200 mM).

V- 3. Estimation de la germination

Les graines sont considérées comme germées si les longueurs des racines et des coléoptiles sont situées entre 2 et 3 mm. Le pourcentage de germination est calculé à la fin de l'essai en déterminant le nombre total des graines germées×100. La cinétique de germination est déterminée en comptant tous les deux jours le nombre de graines germées. Les longueurs de l'épicotyle et des racines des différents traitements sont également mesurées.

V- 4. Etude de la croissance de *Triticum durum* L.

Les graines désinfectées par l'hypochlorite de sodium et rincées abondamment à l'eau distillée sont plantées à raison de 5 graines sur une profondeur de 1 cm dans des pots contenant du sol fertile stérile (110°C/30 min). Des solutions stériles additionnées de NaCl (0, 100 et 200 mM) et/ou d'extrait d'halophyte (10 ml), ou de la solution bactérienne (5 ml) sont ajoutées tous les deux jours. Les pots sont recouverts dans un premier temps par des couvercles transparents afin d'éviter l'évaporation des solutions. L'étude comporte douze traitements expérimentée en triplicata. Elle est réalisée dans des conditions lumière/obscurité naturelles à 20°C pendant un mois. Durant cette période, les différents paramètres liés à la croissance du blé (longueurs, poids sec des tiges et de racines, teneurs en chlorophylles a et b, totale, en caroténoïdes et en proline) sont déterminées.

Tab. 8: Composition des 12 traitements (T) pour l'étude de la germination et la croissance de *Triticum durum* L.

T	Expérience 1	T	Expérience 2	T	Expérience 3
1	Témoin (0mM)	5	100mM/NaCl	9	200mM/NaCl
2	0mM + <i>S. vermiculata</i> +	6	100mM+ <i>S. vermiculata</i> +	10	200mM+ <i>S. vermiculata</i> +
3	0mM+ SF5	7	100mM +SF5	11	200mM+ <i>S. vermiculata</i> + SF5
4	0mM+ <i>S. vermiculata</i> +SF5	8	100mM+ <i>S. vermiculata</i> +SF5	12	200mM+ <i>S. vermiculata</i> +SF5

V- 4-1. Mesure de la croissance du blé dur

V- 4-1-1. Mesure de la longueur des tiges

La hauteur de *T. durum* mesurée à l'aide d'une règle graduée permet d'analyser l'effet de sel, de l'halophyte et de la souche bactérienne sur la croissance du blé dur sous stress salin par rapport aux témoins.

V- 4-1-2. Mesure du poids sec des racines et des tiges

Les racines et les tiges de *T. Durum* obtenues sont lavées et rincées à l'eau distillée, séchées à 78°C pendant 48 heures puis mesurés (g/plante).

V- 4-1-3. Mesure des teneurs des pigments photosynthétiques ; chlorophylles a, b et totale et caroténoïdes

0,1 g de feuilles de blé collecté après 30 jours du début de l'étude sont broyés dans de l'acétone 80% (V/V), (0,1 g/ 10 ml d'acétone) puis filtrés par du papier filtre. Un autre volume d'acétone (5 ml) est ajouté à la solution récupérée. Celle-ci récupère les chlorophylles a et b. L'absorbance est déterminée à 663,2 ; 646,8 et 470 nm. Les concentrations de ces pigments sont calculées comme suit (Shahba *et al.*, 2010):

$$\text{Chl. a } (\mu\text{g/ml}) = 12.5 A_{663.2} - 2.79 A_{646.8}$$

$$\text{Chl. b } (\mu\text{g/ml}) = 21.51 A_{646.8} - 5.1 A_{663.2}$$

$$\text{Chl. total } (\mu\text{g/ml}) = \text{Chl. a} + \text{Chl. b}$$

$$\text{Car } (\mu\text{g/ml}) = (1000 A_{470} - 1.8 \text{ Chl a} - 85.02 \text{ Chl b})/198$$

V- 4-1-4. Détermination de la teneur en proline

0.5 g de feuilles de blé est extrait par 3% d'acide sulfosalicylique. Un extrait de 2 ml est chauffé 1 heure dans un bain-marie avec l'addition de 2 ml de ninhydrine et 2 ml d'acide acétique glacial. Après refroidissement, 4 ml de toluène sont ajoutés. La teneur en proline ($\mu\text{g/g}$ matière fraîche) est déterminée par spectrophotométrie à 520 nm contre un échantillon standard de proline. (Carpici *et al.*, 2010).

V-5. Etude statistique

L'étude statistique a concerné une analyse séparée des paramètres de la croissance de *Triticum durum* L. (ANOVA) entre les 12 traitements. Les valeurs analysées par ANOVA sont représentées par la moyenne \pm écart type.

De plus, une analyse combinée des paramètres (ACP) est également réalisée, elle consiste à l'étude de la corrélation des différents paramètres pour chaque expérience.

**RESULTATS ET
DISCUSSION**

Dans le cadre de ce travail, l'isolement des actinomycètes et l'étude de leur aptitude à produire des substances antibactériennes, antifongiques et de l'acide indole acétique est mené. En outre, l'effet de NaCl et d'osmoprotecteurs synthétiques (glycine bêtaïne, proline et tréhalose) et naturels (halophyte ; *S. vermiculata*) sur la croissance des souches d'actinomycètes: *Streptomyces* sp. MADO 2, *Nocardioopsis* sp. MADO3 et la souche isolée SF5 est également étudié. D'autre part, la germination et la croissance *Triticum durum* L. en présence de NaCl, de la souche SF5 et/ou d'extrait de *S. vermiculata*. sont aussi analysées.

I- Isolement des actinomycètes

Les caractéristiques du sol prélevé sont les suivantes ; pH= 7.68, conductivité électrique = 277.5 μ s et concentration en NaCl = 3.13 g/l. Les dénombrements des actinomycètes sur milieu amidon-caséine sont de 2.10^5 UFC/ml, 07 souches sont isolées, elles diffèrent par la couleur des mycélia aérien et végétatif (Tab.9).

Tab. 9: Caractères morphologiques des mycélia aérien et végétatif des actinomycètes isolées sur milieu amidon-caséine.

Colonie	Mycélium aérien	Mycélium végétatif	Taille (mm)
SF1	Blanc	Blanc	1-2
SF2	Beige	Transparent	2
SF3	Vert	Vert huileux	3- 4
SF4	Gris	Vert	4
SF5	Blanc	Jaune	2
SF6	Gris	Rose-rouge	2- 3
SF7	Rose	Rose- clair	0.2-0.4

Toutes les souches isolées sont à Gram positif, les cellules présentent un aspect filamenteux ou mycélien. Les caractéristiques culturales de la souche SF5 cultivée sur milieux ISP 2, ISP 3, ISP 4 et ISP 5 sont les suivantes :

Mycélium aérien : Gris sur ISP 2, ISP 3 et ISP 5, gris-vert sur ISP 4.

Mycélium végétatif : orange.

I-1. Discussion

Les actinomycètes sont des bactéries mycéliennes à Gram positif, aérobies et hétérotrophes. Elles présentent certaines analogies avec les champignons : structure mycélienne présentant des ramifications, formation fréquente d'un mycélium aérien et de conidie, etc...Leurs filaments mycéliens sont très fins (1- 1.5 μm). Elles sont considérées comme le groupe majeur de la population tellurique et sont largement distribuées dans les sols (Küster et Williams, 1964). Elles se développent très lentement par rapport à la plupart des bactéries et des champignons, leur croissance sera donc masquée sur des milieux de culture ordinaires (Ottow et Glathe, 1968). Ce groupe de procaryotes est connu par son activité à fixer l'azote et à produire des métabolites secondaires et de phytohormones (Barreto *et al.*, 2008).

Puisque les actinomycètes sont souvent en interaction compétitive avec d'autres micro-organismes du sol, les milieux d'isolement doivent être destinés à réduire leur développement sans affecter celui des actinomycètes (Hayakawa, 2008). De nombreuses méthodes existent afin de faciliter leur isolement. Il n'est pas difficile d'isoler ce groupe bactérien à partir d'un mélange contenant des champignons, parce que les propriétés physiologiques de ces deux groupes sont différentes. Par exemple, les antifongiques n'affectant pas la croissance des actinomycètes sont très largement utilisés. Cependant, il n'est pas facile de séparer les actinomycètes des bactéries (El-Nakeeb et Lechevalier, 1962).

Des techniques d'enrichissement et de prétraitement du sol sont développées pour isoler sélectivement les actinomycètes et essentiellement celles considérées comme rares (Tab. 3 et 4). Le traitement par le carbonate de calcium est la méthode la plus fiable parce qu'elle permet d'isoler des taux très élevés d'actinomycètes (Tab 4). Cependant, celui-ci sélectionne les mêmes genres actinomycétales. Le milieu arginine-glycérol-salt (AGS) permet l'isolement de différents types de colonies par rapport au prétraitement par le CaCO_3 (El-Nakeeb et Lechevalier, 1962). Dans notre étude, Le traitement du sol (60°C/60 min) a réduit le nombre des bactéries à Gram négatif (Vijayakumar *et al.*, 2007). Toutes les bactéries isolées sont à Gram positif présentant un aspect mycélien (fins filaments). Le nombre des actinomycètes est de $2.5 \cdot 10^5$ UFC/ml. Selon Baskaran *et al.* (2011), quatre prétraitements sont avérés importants pour isoler le maximum de ces bactéries, parmi lesquels, le sol traité à 70°C pendant 15 min donne un nombre de $2.2 \cdot 10^7$ UFC/ml, tandis qu'un traitement à 100°C pendant 60 min permet l'isolement de $4 \cdot 10^6$ UFC/ml, et celui de

55°C pendant 60 min donne $1.6.10^7$ UFC/ml. Le traitement thermique favorise la sélection des actinomycètes et l'inhibition des bactéries à Gram négatif (Pisano *et al.*, 1986), à ceci, s'ajoute bien sûr l'effet de l'acide nalidixique. L'utilisation des antibiotiques pour inhiber sélectivement les bactéries et favoriser la croissance des actinomycètes est d'un appui extrêmement utile. (Porter *et al.*, 1960). Les antibactériens les plus utilisés sont la polymixine (5µg/ml), la pénicilline (1µg/ml) et l'acide nalidixique (10µg/ml). Selon Williams et Davies, (1965), la nystatine inhibe la majorité des champignons (50µg/ml) alors qu'elle n'affecte pas la croissance des actinomycètes malgré l'augmentation de sa concentration (100µg/ml).

La salinité, le pH, la température, le pourcentage en matière minérale et organique et la nature du sol influencent largement l'abondance des actinomycètes et affectent la dominance de certains genres par rapport à autres (Jiang et Xu, 1990 ; Saadoun et Al-Moumani, 1997 ; Norovsuren *et al.*, 2007). Des actinomycètes rares (*Actinoplanes* et *Streptosporangium*) sont retrouvées dans des sols arides à pH alcalin, alors que ceux considérés comme acides renferment des taux assez faibles de ces bactéries où *Streptomyces* représente le genre dominant (Arifuzzaman *et al.*, 2010). Ce groupe microbien est très abondant dans les sols riches en matière organique (Mitsuiki *et al.*, 2002). D'un autre côté, le nombre des actinomycètes mésophiles et cryophiles isolées à partir d'un sol de Qinghai (Chine) est respectivement de $1.86.10^6$ et $8.55.10^4$ UFC/ml (Cai *et al.*, 2009). Des numérations de $13.6.10^3$ UFC/ml (à 26°C) et $2.4.10^3$ UFC/ml (à 10°C) sont obtenues à partir des sols de l'île de Baffin (Canada) (Strzelczyk *et al.*, 1968). Selon Barreto *et al.* (2008), la diversité de ces populations varie aussi selon leurs habitats d'isolement; chez *Theobroma cacao* par exemple, le nombre d'actinomycètes est plus important dans le sol ($1.6.10^6$ UFC/ml) que dans la rhizosphère ($1.5.10^5$ UFC/ml), ceci est dû à la faible capacité compétitive de ces bactéries au niveau des racines (Kennedy, 1999). Si la plupart des actinomycètes sont d'origine terrestre, quelques unes sont parfois retrouvées dans les environnements marins et sont halophiles d'où l'appellation d'actinomycètes marines (Lakshmiathy et Kannabiran, 2009).

Dans notre cas, le milieu amidon-caséine est utilisé spécifiquement pour l'isolement des actinomycètes, il contient des substrats sélectifs pour leur croissance (amidon et caséine). Il convient à la sélection des grands groupes d'actinomycètes, *Streptomyces* (Hagedorn, 1976) et *Actinomonospora*, *Actinopolyspora* et *Planomonospora* (Suzuki *et al.*, 2001). La caséine, la chitine, l'acide humique, le L- arginine, l'amidon et le glycérol

constituent les sources de carbone et d'azote les plus appropriées pour isoler les actinomycètes (Porter *et al.*, 1960 ; Küster et Williams, 1964 ; Cho *et al.*, 1994). Le milieu amidon-caséine additionné de nystatine et d'actidione permet un bon développement du mycélium aérien et est considéré comme le milieu de choix pour la sélection de ces bactéries (Williams et Davies, 1965). Le HV agar permet l'isolement des streptomycètes et d'autres genres rares (Hayakawa et Nonomura, 1987). Selon Cai *et al.* (2009), la composition du milieu de culture influence considérablement les numérations bactériennes (Tab. 5). Le milieu arginine-glycérol-sel favorise l'isolement des actinobactéries par comparaison à d'autres milieux tels que le glucose-asparagine, le glycérol-asparagine, le milieu de Benedict modifié et le milieu œuf- albumine (El-Nakeeb et Lechevalier, 1962) (Tab. 10).

Tab.10: Efficacité de quelques milieux sélectifs dans l'isolement des actinomycètes (El-Nakeeb et Lechevalier, 1962).

Milieux sélectifs	Actinomycètes x10 ⁶ UFC/ g du sol
Arginine-glycérol-sel	29.9
Œuf-albumine	29.4
Benedict modifié	18.6
Glycérol- asparagine	16.6
Glucose-asparagine	14.5

Le milieu amidon-caséine additionné des trois antibiotiques a permis l'isolement de sept souches d'actinomycètes. Les colonies matures de la souche SF5 sont sèches, poudreuses et à bords plats. Cette forme est caractéristique des colonies du genre *Streptomyces* (Petrosyan *et al.*, 2003). Les colonies ont des contours réguliers, la couleur du mycélium aérien est blanche, celle du mycélium végétatif est jaune. Selon Pridham (1965), la couleur des mycélia aérien et végétatif est considérée comme un bon critère dans la caractérisation des streptomycètes. Les colonies ont une odeur du sol caractéristique de *Streptomyces* (Locci, 1989). En se basant sur les caractères morphologiques et culturels (Locci, 1989), cet isolat est désigné comme étant *Streptomyces*.

Dans le sol, les streptomycètes sont considérés comme les bactéries les plus communes, ils constituent souvent la proportion majeure de la population des actinomycètes. *Streptomyces* est le genre le plus dominant dans différents types de sols (Lechevalier et Lechevalier, 1967) (Tab. 11). Lorsque les techniques conventionnelles d'isolement sont appliquées, la plupart des isolats sont identifiés comme étant *Streptomyces* (Hayakawa et Nonomura, 1989). La distribution des différents genres d'actinomycètes dans divers sédiments marins (Inde) a montré une prédominance de *Streptomyces* (57.4%), *Actinopolyspora* (14.7%), *Saccharopolyspora* (10.3%) et *Actinomadura* (5.9%), *Nocardiopsis* (4.4%), *Micromonospora* (2.9%), *Actinoplanes* et *Actinomyces* (1.5%) (Vijayakumar *et al.*, 2007).

Tab. 11: Fréquence des genres d'actinomycètes dans différents types de sol

(Lechevalier et Lechevalier, 1967).

Genres isolés	Nombre (%)
<i>Streptomyces</i>	95,34
<i>Nocardia</i>	1.98
<i>Micromonospora</i>	1.40
<i>Thermomonospora</i>	0.22
<i>Actinoplanes</i>	0.20
<i>Streptosporangium</i>	0.10
<i>Actinomadura</i>	0.10

II- Mise en évidence des activités antibactérienne et antifongique

II-1. Cas de *Streptomyces* sp MADO2 et *Nocardiosis* sp. MADO3

La méthode des disques d'agar fournit une idée sur les souches ayant un effet antagoniste sur les bactéries pathogènes testées. *Streptomyces* sp MADO2 et *Nocardiosis* sp. MADO3 sont douées d'une activité antibactérienne considérable vis-à-vis toutes les souches (Tab. 12).

Tab. 12 : Effet antagoniste de *Streptomyces* sp. MADO2 et *Nocardiosis* sp MADO3 vis-à-vis quelques souches bactériennes pathogènes.

	<i>Escherichia coli</i>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>
<i>Streptomyces</i> sp.	+ 3 mm	++ 9 mm	+ 6 mm	+++ 13 mm	+ 5 mm
<i>Nocardiosis</i> sp.	+ 8 mm	+ 4 mm	+++ 13 mm	+++ 12 mm	+ 7 mm

Concernant l'activité antifongique mise en évidence contre *Aspergillus niger*, *A. flavus* et *Penicillium citrinum*, *Nocardiosis* sp. MADO3 inhibe la croissance de tous les champignons testés tandis que *Streptomyces* sp. MADO2 affecte seulement le développement de *A.niger* (Tab. 13).

Tab. 13 : Activité antifongique de *Streptomyces* sp. MADO2 et *Nocardiosis* sp MADO3 vis-à-vis de *A. niger*, *A. flavus* et *P. citrinum*.

	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Penicillium citrinum</i>
<i>Streptomyces</i> sp.	++	-	-
<i>Nocardiosis</i> sp.	++	++	++

De plus, ces deux actinomycètes inhibent fortement la croissance d'autres souches pathogènes. *Streptomyces* sp.MADO2 exerce une activité antimicrobienne significative contre *C. albicans* PC1 (23 mm), *E. coli* PC2 (16 mm) *P. mirabilis* PC3 (26 mm), *M. luteus* PC6 (27 mm) et *S. aureus* PC11 (26 mm). Il est plus actif que *Nocardioopsis* sp. : *C. albicans* PC1 (14 mm), *E. coli* PC2 (00 mm), *P. mirabilis* PC3 (12 mm), *M. luteus* PC6 (23 mm) et *S. aureus* PC11 (19 mm) (Tab. 14).

Tab. 14 : Activité antimicrobienne de *Streptomyces* sp. MADO2 et *Nocardioopsis* sp. MADO3 vis-à-vis quelques souches pathogènes.

Souches pathogènes	Zone d'inhibition (mm)	
	<i>Streptomyces</i> sp. MADO2	<i>Nocardioopsis</i> sp. MADO3
<i>C. albicans</i> PC1	23	14
<i>E. coli</i> PC2	16	00
<i>P. mirabilis</i> PC3	26	12
<i>S.haemolytticus</i> PC4	12	08
<i>P. aeruginosa</i> PC5	13	16
<i>M. luteus</i> PC6	27	23
<i>S. epidermidis</i> PC 7	22	14
<i>E. faecalis</i> PC 8	16	13
<i>K. pneumoniae</i> PC 9	08	11
<i>B. subtilis</i> PC 10	23	22
<i>S. aureus</i> PC 11	26	19

II-2. Cas des actinomycètes isolées du sol

Les souches actinomycétales telluriques possèdent un effet antagoniste hétérogène vis-à-vis les bactéries testées. Néanmoins, la souche SF5 est efficace sur toutes les souches, *S. aureus* (18 mm), *B. cereus* et *P. aeruginosa* (12 mm). La souche SF4 possède également un pouvoir antibactérien sur toutes les bactéries pathogènes étudiées avec des diamètres d'inhibition moins importants : *S. aureus* (6 mm), *B. cereus* (8 mm) et *P. aeruginosa* (10 mm) (Tab. 15).

Tab. 15 : Effet antagoniste des souches actinomycétales isolées du sol vis-à-vis quelques souches bactériennes pathogènes.

	<i>E. coli</i>	<i>B.cereus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. typhimurium</i>
SF1	+++ 18 mm	++ 12 mm	-	+ 7 mm	++ 9 mm
SF2	++ 10 mm	+++ 19 mm	+ 6 mm	-	+ 8 mm
SF3	+++ 16 mm	+++ 15 mm	-	-	+ 8 mm
SF4	+ 7 mm	+ 8 mm	++ 10 mm	+ 6 mm	+ 4 mm
SF5	++ 10 mm	+++ 12 mm	+++ 12 mm	+++ 18 mm	+ 7 mm
SF6	++ 12 mm	+ 5 mm	+ 6 mm	-	+ 6 mm
SF7	++ 10 mm	+ 4 mm	-	+++ 12 mm	+ 4 mm

D'un autre côté, les actinomycètes du sol révèlent une activité antifongique différente, les souches SF4 et SF1 présentent une activité importante. La souche SF5 est sans effet inhibiteur sur la croissance de *A. Flavus* (Tab. 16).

Tab. 16 : Activité antifongique des actinomycètes isolées du sol vis-à-vis de *A. niger*, *A. flavus* et *P. citrinum*.

	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Penicillium citrinum</i>
SF1	++	++	++
SF2	++	++	-
SF3	+	+	+
SF4	++	++	++
SF5	++	-	++
SF6	+	+	+
SF7	+	+	-

II- 3. Discussion

Les métabolites secondaires produits par les microorganismes représentent une large source de composés d'une diversité structurale très variable et des milliers d'entre eux sont doués d'une potentielle d'activité biologique. La capacité à produire de tels produits est limitée à des groupes de microorganismes eucaryotes et de bactéries en particulier les actinomycètes (Donadio *et al.*, 2002). Ces dernières sont à l'origine de 70% des antibiotiques naturels connus dans le monde, principalement celles appartenant au genre *Streptomyces* considéré jusqu'à maintenant le genre le plus important (Pinet et Demain, 1988 ; da Silva Sousa *et al.*, 2008).

Les microorganismes marins produisent de nombreux antibiotiques, parmi lesquels certaines espèces sont impliquées dans la synthèse de nouvelles classes thérapeutiques (Williams, 2009). *Streptomyces* sp. MADO2 et *Nocardiopsis* sp. MADO3 sont doués d'activités antimicrobiennes contre les souches pathogènes testées. *Nocardiopsis* sp. VITSK5 (FJ973467) isolé à partir des sédiments marins collectés (Inde) est actif contre les bactéries à Gram négatif : *E. coli* (20 mm), *P. aeruginosa* (18 mm) et *K. pneumonia* (15 mm) et à Gram positif *E. faecalis* (20 mm), *B. cereus* (13 mm) and *S. aureus* (6 mm). Son activité antifongique est importante vis-à-vis de *A. fumigatus* (23 mm), *A. flavus* (15 mm) et *A. niger* (12 mm) (Vimal *et al.*, 2009).

Cette étude a démontré la capacité de *Streptomyces* sp. SF5 isolé du sol à produire des substances antibactériennes et antifongiques. De nombreuses actinomycètes telluriques produisent des antibiotiques et jouent donc le rôle d'antagonistes (Stevenson, 1956). Les *Streptomyces* sont largement étudiés en raison de leur pouvoir de produire une large gamme d'antibiotiques (Pinet et Demain, 1988). Selon Denizci (1996), sur 356 espèces de *Streptomyces* isolés, 36% des isolats possèdent des activités antibactériennes contre *Staphylococcus aureus* (20.78%), *E. coli* (2.52%), *Micrococcus luteus* (18.25%), *Mycobacterium smegmatis* (22.47%) et *Bacillus subtilis* (12.07%).

III. Screening des souches d'actinomycètes productrices de l'acide indole acétique et optimisation des conditions de croissance et de production

III-1- Screening des actinomycètes productrices de l'AIA

Les souches actinomycétales isolées du sol et celles de référence *Streptomyces* sp. MADO2 et *Nocardiopsis* sp. MADO3 produisent de l'AIA à des taux variables. *Streptomyces* sp. SF5 et *Nocardiopsis* sp. MADO3 accumulent l'AIA à des teneurs respectives à 55.58 ± 0.7 et $39,38 \pm 0.5$ $\mu\text{g/ml}$ (Tab. 17).

Tab. 17 : Production de l'AIA par les différentes souches actinomycétales du sol et celles de référence (MADO2 et MADO3).

Souche actinomycétale	Acide indole acétique ($\mu\text{g/ml}$).
SF1	33.71 ± 0.3
SF2	<u>42.28 ± 0.3</u>
SF3	<u>40.85 ± 0.2</u>
SF4	38.57 ± 0.5
SF5	<u>55.58 ± 0.7</u>
SF6	18.57 ± 0.4
SF7	23.57 ± 0.6
MADO2	22.78 ± 0.6
MADO3	<u>$39,38 \pm 0.5$</u>

III-2- Croissance de *Streptomyces* sp.SF5 et *Nocardioopsis* sp. MADO3 et production de l'acide indole acétique

La croissance et la production de l'AIA par *Streptomyces* sp. SF5 et *Nocardioopsis* sp. MADO3 sont étudiées simultanément afin d'analyser les effets des concentrations du L-tryptophane, du pH, de la température et les diverses teneurs de NaCl.

III-2-1. Cas de *Streptomyces* sp. SF5

III-2-1-1. Effet des concentrartions du L-tryptophane

L'effet des concentrations du L-tryptophane (2, 5 et 7 mg/ml) sur la croissance et la production de l'AIA est variable. La croissance est maximale (absorbance=1.276±0.022) à une teneur de 2 mg/ml de L-tryptophane. Quant à la production de l'AIA, celle-ci atteint sa teneur maximale (104,76±0.2 µg/ml) quand le milieu de culture est additionné de 5mg/ml de cet acide aminé (Fig. 1).

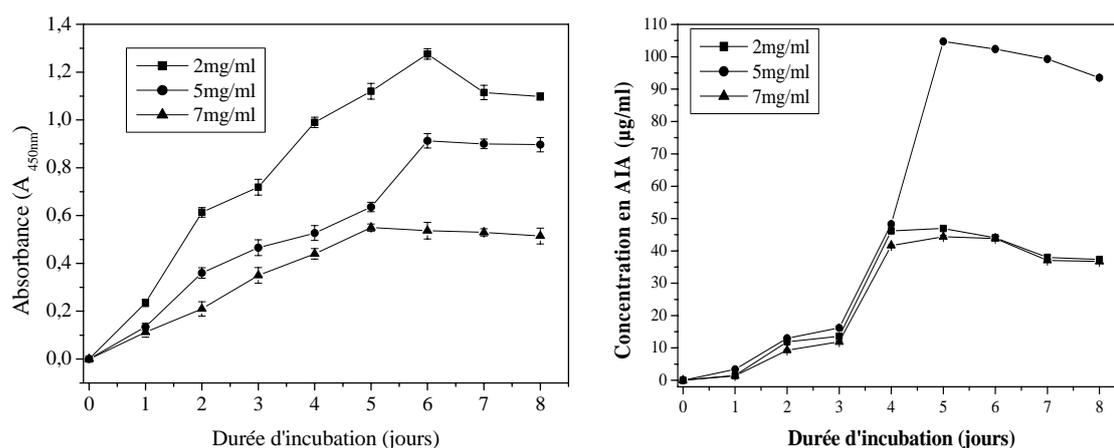


Fig. 1 : Effet des concentrations du L-tryptophane sur la croissance et la production de l'AIA chez *Streptomyces* sp. SF5.

II-2-1-2. Effet du pH

Les pH acides et alcalins influencent négativement la croissance et la production de l'AIA. Les absorbances sont respectivement de 0.786±0.04, 0.845±0.05, 1.154 ±0.02, 0.796±0.05 et 0.479±0.02 aux pH de 5, 6, 7, 8 et 9. La production de l'AIA est maximale (100.02±0.4 µg/l) à pH=7. Des taux faibles en AIA sont obtenus principalement à pH=5 (53.41±0.4 µg/ml) et à pH=9 (37.7±0.2 µg/ml) (Fig. 2).

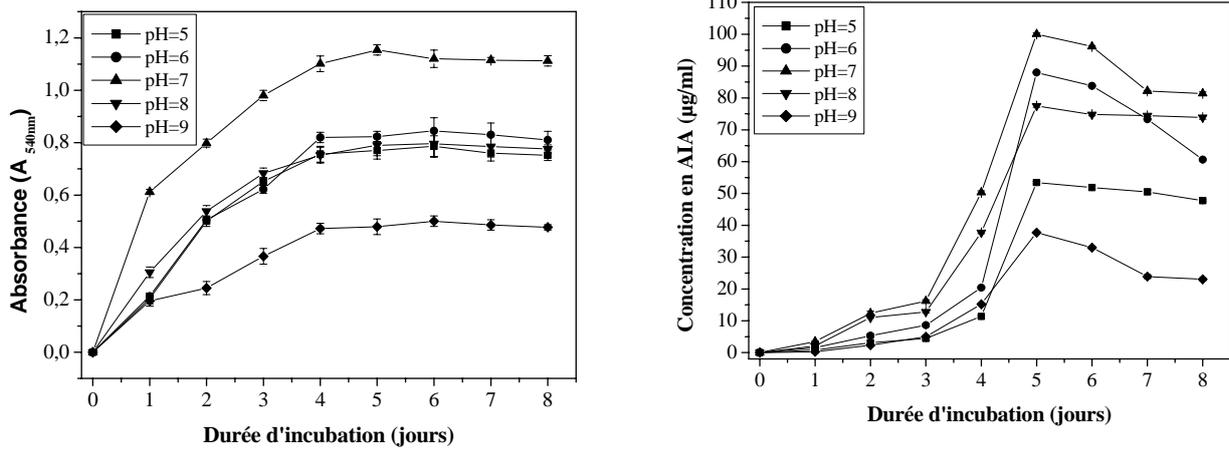


Fig. 2 : Effet du pH sur la croissance et la production de l’AIA chez *Streptomyces* SF5.

II-2-1-3. Effet de la température

Des températures de 30°C et 25°C semblent favorables pour la croissance et la production de l’AIA. Elles sont respectivement de $(1.128 \pm 0.01, 1.119 \pm 0.015)$ et $(104,76 \pm 0.6, 91,27 \pm 0.5 \mu\text{g/ml})$ (Fig.3).

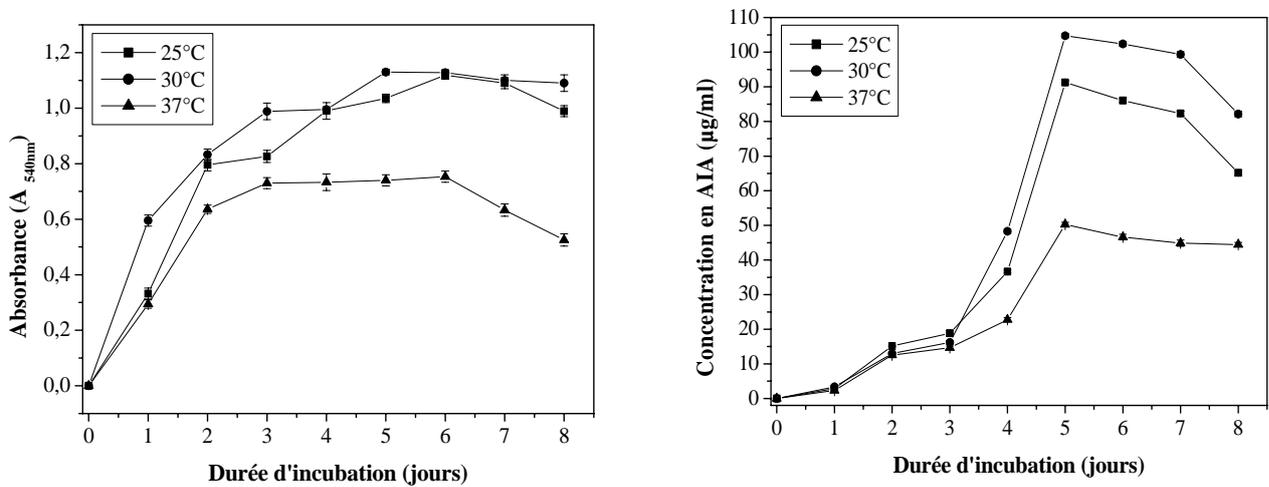


Fig. 3 : Effet de la température sur la croissance et la production de l’AIA chez *Streptomyces* sp. SF5.

III-2-1-4. Effet du NaCl

Le NaCl (principalement à 500 mM) exerce une action inhibitrice sur la croissance et la production de l'AIA (Absorbance=0.656±0.03 et teneur en AIA= 47.43±0.2 µg/ml). Ces deux paramètres atteignent des valeurs maximales en absence de NaCl, elles sont respectivement de 1.165±0.02 et 104.76±0.6 µg/ml (Fig. 4).

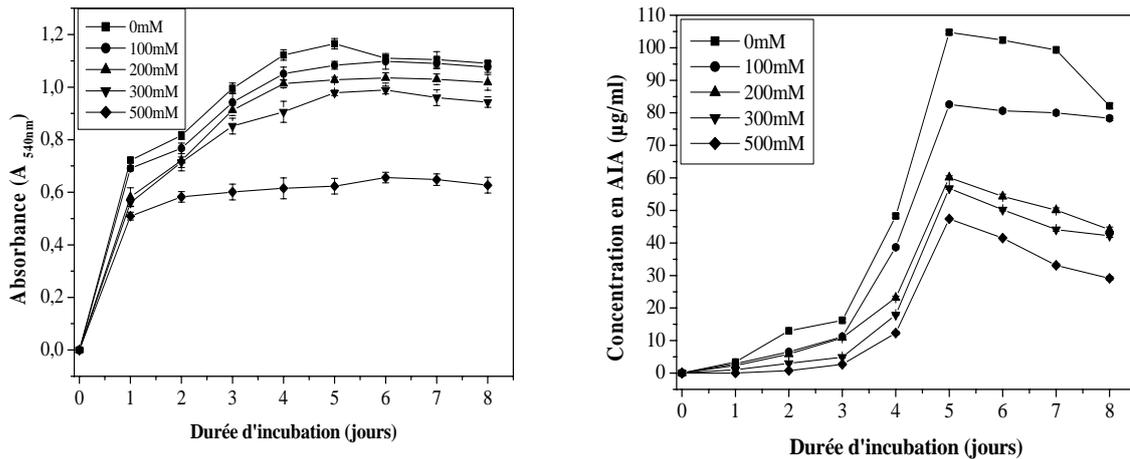


Fig. 4 : Effet du NaCl sur la croissance et la production de l'AIA chez *Streptomyces* sp. SF5.

III-2-2. Cas de *Nocardiosis* sp. MADO3

III-2-1. Effet des concentrations du L-tryptophane

2 mg/ml de tryptophane est favorable pour la croissance et la production de l'AIA. Les absorbances en présence de 2, 5 et 7 mg/ml sont respectivement de 1.035±0.02, 0.799±0.045 et 0.552±0.05. Parallèlement, les teneurs en AIA sont de 39,45±0.22, 35,91±0.5 et 32.65±0.2 µg/ml (Fig. 5).

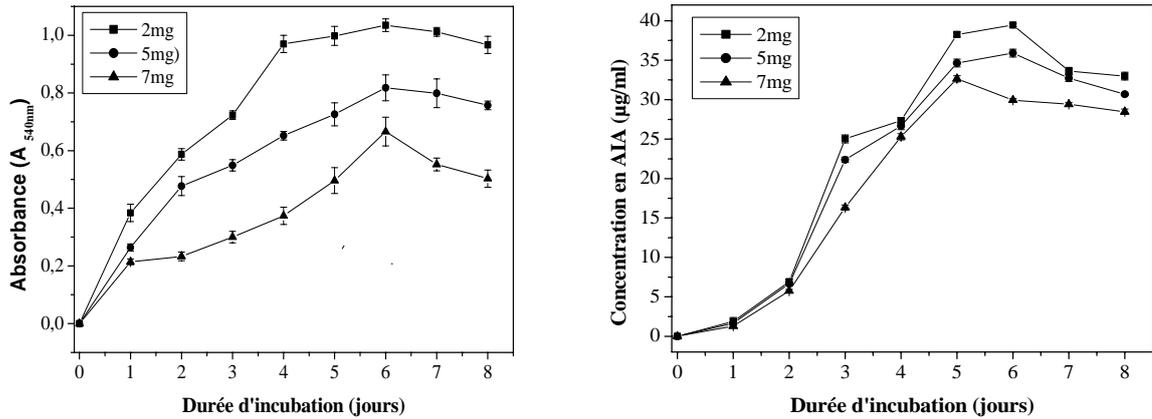


Fig. 5 : Effet des concentrations du L-tryptophane sur la croissance et la production de l'AIA chez *Nocardiosis* sp. MAD03.

III-2-2. Effet du pH

Un pH neutre (7) favorise la croissance (Absorbance=0.982±0.03) et la production de l'AIA (41,42±0.1µg/ml). De part et d'autre, les teneurs en AIA diminuent (pH=6 : 37,14±0.4, pH=9 : 22,14±0.5 µg/ml) (Fig. 6).

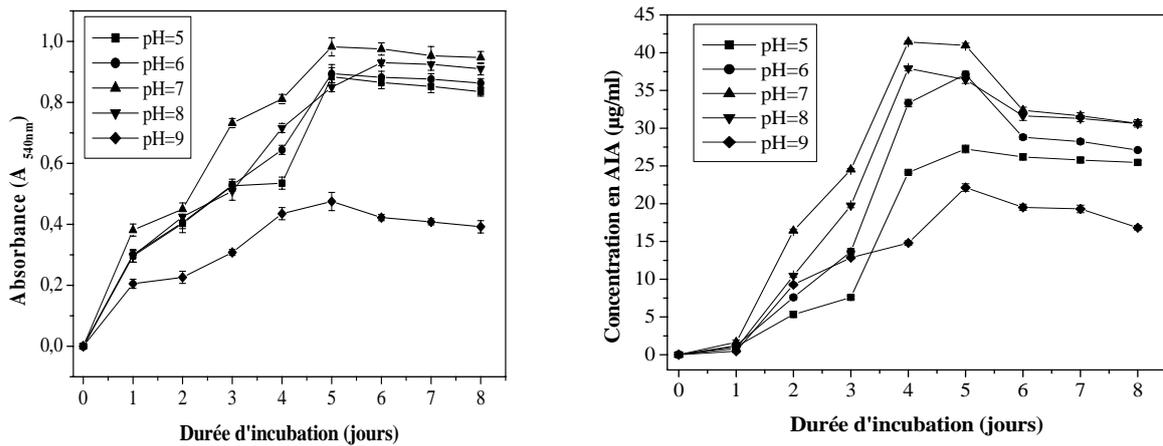


Fig. 6 : Effet du pH sur la croissance et la production de l'AIA chez *Nocardiosis* sp. MAD03.

III-2-3. Effet de la température

La croissance de *Nocardiosis* sp. est moins importante à 25°C (absorbance= 0.982±0.02) par rapport à celle observée à 30°C (absorbance= 1.058±0.04). Elle est inhibée à 37°C (absorbance= 0.575±0.01). La production de l'AIA est maximale (40,78±0.8µg/ml) à 30°C et atteint une teneur de 34,04±0.5 µg/ml à 25°C (Fig. 7).

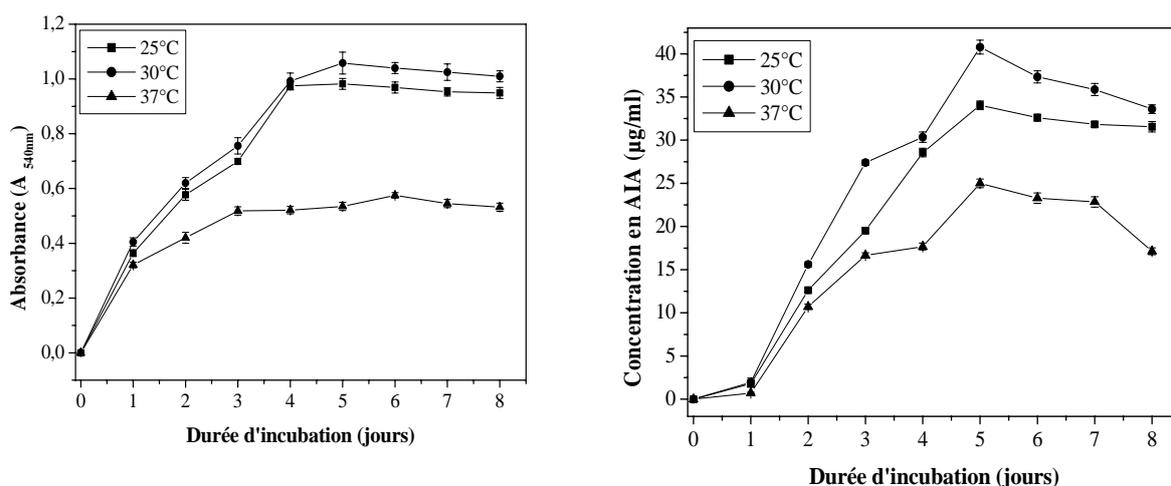


Fig. 7 : Effet de la température sur la croissance et la production de l'AIA chez *Nocardiosis* sp. MAD03.

III-2-4. Effet du NaCl

La croissance de *Nocardiosis* sp. MAD03 atteint des valeurs maximales à 500 mM/ NaCl, elle est faible en absence de sel. Les absorbances sont respectivement de 1.156±0.02, 1.122±0.04 et 1.075±0.01 en présence de 500, 300 et 200 mM. Cependant, des teneurs élevées en NaCl exercent une action inhibitrice sur la production de l'AIA : 32.67±0.5, 25.51±0.6 et 19.83±0.5 µg/ml à 200, 300 et 500 mM/NaCl. Des teneurs maximales en AIA sont observées à 0 et 100 mM/NaCl, elles sont respectivement de 41,6±0.5 et 41,02±0.4 µg/ml (Fig. 8).

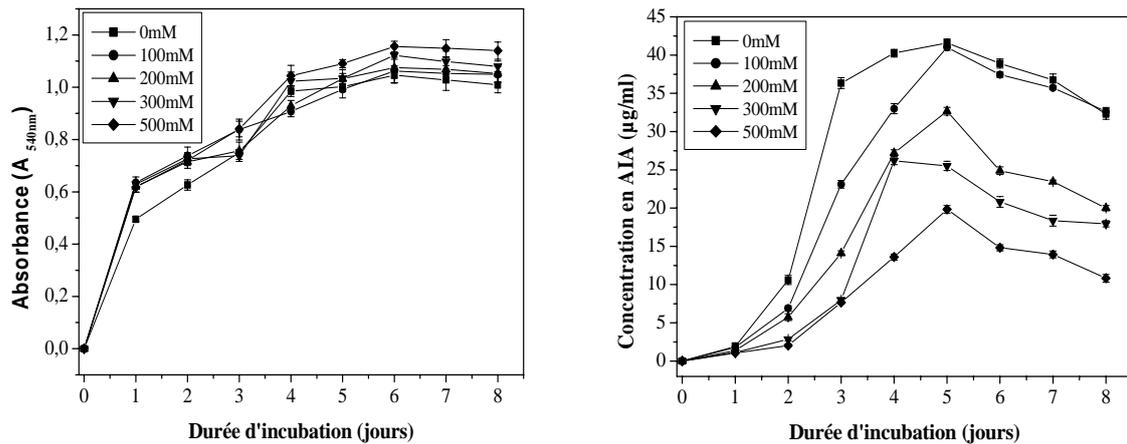


Fig. 8 : Effet du NaCl sur la croissance et la production de l'AIA chez *Nocardiosis* sp. MADO3.

III-3. Discussion

L'acide indole acétique (AIA) est considéré comme le composé physiologique le plus actif parmi les auxines. Il provient du métabolisme du L-tryptophane chez de nombreux microorganismes (Ghosh et Basu, 2006) dont les champignons et les bactéries (Loper et Schroth, 1986). L'AIA est également produit par les jeunes feuilles et les graines de végétaux à partir des réactions de transamination et de décarboxylation du L-tryptophane (Sachdev *et al.*, 2009). *Streptomyces* sp. est le genre le plus impliqué dans la production de l'AIA (Narayana *et al.*, 2007). Les espèces *olivaceoviridis*, *rimosus* et *rochei* produisent suffisamment l'AIA et améliorent ainsi la croissance végétale en augmentant le taux de germination, l'élongation racinaire et le poids sec des racines (Tokala *et al.*, 2002).

Streptomyces sp. SF5 isolé du sol et la souche de référence *Nocardiosis* sp. MADO3 produisent respectivement des teneurs de 55,58 et 39,38 µg/ml. Selon Khamna *et al.* (2010), les actinomycètes isolées de la rhizosphère de certaines plantes médicinales accumulent l'AIA à des teneurs de 11- 144 µg/ml. Certaines espèces de *Pseudomonas* en produisent à des concentrations de 20-36 µg/ml. Des teneurs de 5- 24 µg/ml sont obtenues avec des souches de *Azotobacter* (Ahmad *et al.*, 2005).

L'effet du L-tryptophane sur la croissance et la production de l'AIA chez les deux bactéries varie énormément selon la concentration. Une teneur de 5mg/ml semble favorable pour la production de l'AIA (104,76µg/ml) chez la souche SF5. Les teneurs en

AIA obtenues en présence de 2 et 7 mg/ml de L-tryptophane sont respectivement de 46.93 et 44,38 µg/ml. Quant à *Nocardiosis* sp. MADO3, 2 mg/ml de L-tryptophane est favorable pour la production de cette auxine. Les teneurs sont respectives à 39,45, 35,91 et 32,65 µg/ml en présence de 2, 5 et 7mg/ml de L-tryptophane. Le L-tryptophane (2 mg/ml) constitue la concentration optimale pour la production de l'AIA chez *Streptomyces* CMU-H009, cependant, curieusement des teneurs élevées exercent des effets adverses sur celle-ci (Khamna *et al.*, 2010). Des espèces de *Rhizobium* produisent l'AIA à un taux maximal (30.2 µg/ml) en présence de 3 mg/ml de L-tryptophane par comparaison aux teneurs de (1, 2, 2.5 et 3.5 mg/ml) (Sridevi et Mallaiah, 2008). Selon Ahmad *et al.* (2005), des concentrations de 2 et 5 mg/ml de L-tryptophane ont des effets différents sur la production de cette phytohormone chez différentes souches de *Pseudomonas* sp. et de *Azotobacter* sp, une teneur de 5mg/ml de L-tryptophane aboutit à des concentrations élevées en AIA (Tab. 18).

Tab. 18 : Production de l'AIA (µg/ml) par des souches de *Azotobacter* (AZS) et de *Pseudomonas* (PS) après 15 et 7 jours d'incubation respectivement.

L-Tryptophane (mg/ml)	AIA (µg/ml)							
	AZS1	AZS5	AZS7	AZS9	PS1	PS3	PS6	PS8
0	7.40	4.33	3.73	4.40	9.64	8.24	6.59	9.28
1	11.53	5.88	1.47	7.25	14.7	24.1	16.6	28.3
2	19.8	13.9	5.99	23.8	27.7	24.8	21.3	37.5
5	27.6	21.80	7.30	28.9	53.2	36.2	32.9	46.4

La croissance est optimale chez *Streptomyces* sp. SF5 et *Nocardiosis* sp.MADO3 en présence de 2mg/ml de L-tryptophane (1.276 et1.035). Des teneurs de 5 et 7 mg/ml exercent des effets adverses sur le développement bactérien.

L'effet du pH sur ces deux paramètres est également étudié, un pH de 7 est favorable à la croissance et à la production de l'AIA chez les deux souches. La synthèse des taux élevés de l'AIA est considérable à pH=7.5 pour la plupart des bactéries (Yurekli *et al.* 2003). Les pH acides ou basiques sont défavorables pour la production de cette auxine car *Streptomyces* et d'autres espèces actinomycétales ont une croissance faible dans

ces conditions (Shirokikh *et al.*, 2007). Selon Sahasrabudhe, (2011), certains isolats de *Rhizobium* produisent de l'AIA en quantités assez faibles aux pH de 5 et 9, cependant un optimum de production est observé à pH=7. Le développement de *Streptomyces* sp. SF5 et *Nocardiosis* sp. MADO3 diminue par des facteurs de 1.46, 1.11 fois (pH=5), 2.40 et 2.06 fois (pH= 9). Quant à la production, cette dernière est réduite par des facteurs de 1.87, 1.52 fois (pH= 5), 2.65 et 1.87 fois (pH=9). D'après ces résultats, il est important de noter qu'il existe une relation étroite entre les deux paramètres étudiés. Le pH affecte la fonction des systèmes enzymatiques et la solubilité de nombreuses substances impliquées dans la croissance bactérienne. Celle-ci ainsi que la production de l'AIA diminuent parallèlement (environ le sixième jour). La réduction des taux de l'AIA chez *Rhizobium* sp. isolé à partir de *Cajanus cajan* est due à la dégradation enzymatique de cette phytohormone (AIA oxydase et l'AIA peroxydase) (Datta et Basu, 2000).

Des températures de 30°C et 25°C sont favorables à la croissance et à la production de l'AIA chez les deux souches. Néanmoins, ces deux dernières atteignent des valeurs maximales à 30°C. A 37°C, la croissance de *Streptomyces* sp. est diminuée par un facteur de 1.49 fois, celle de *Nocardiosis* sp. MADO3 est réduite par 1.84 fois. Une diminution de la production de l'AIA est constatée pour les deux souches, les facteurs de réduction sont respectivement de 2.08 et 1.63 fois pour *Streptomyces* sp. SF5 et *Nocardiosis* sp. MADO3. Des températures (25 à 30°C) permettent un bon développement et une production optimale de l'AIA chez de nombreuses espèces de *Streptomyces* sp. (Aldesuquy *et al.* 1998). *Streptomyces* CMU H009 accumule un maximum d'AIA à 30°C (Khamna *et al.*, 2010). *S. albidoflavus* produit des teneurs élevées en cette auxine à 35°C (pH = 7) (Narayana *et al.*, 2009). Des espèces de *purpurascens*, *coelicolor*, *olivaceus* et *kasugaensis* en produisent à des teneurs de 28.4, 21.8, 14.2 et 51.5 µg/ml dans des conditions de pH=7 et de température de 35°C (Matsukawa *et al.* 2007). Chez *Aspergillus niger*, une température de 25°C et un pH de 6 sont optimales pour la production de l'AIA, parallèlement l'acide gibbérellique est accumulé à 30°C et pH=5 (Bilkay *et al.*, 2010). Des teneurs respectives à 85, 68 et 85 µg/ml (28°C) sont observées chez *A. niger*, *Trichoderma harzianum* et *Penicillium citrinum* (Yadav *et al.*, 2011).

La croissance de *Streptomyces* sp. SF5 est inhibée en présence de concentrations croissantes de NaCl (principalement à 500 mM), elle est diminuée par des facteurs respectifs à 1.77 et 1.17 fois en présence 500 et 300 mM de NaCl. En revanche, *Nocardiosis* sp. MADO3 a montré un optimum de croissance à 500 mM de NaCl. 3% de

NaCl constitue une teneur favorable pour le développement de *Nocardiosis* sp. MADO3. Cependant, la production de l'AIA est réduite chez les deux souches (principalement à 500 mM/NaCl). Les facteurs de réduction de la production de cette auxine chez *Streptomyces* sp.SF5 et *Nocardiosis* sp. MADO3 sont respectivement de 2.20 et 2.09 fois. Ils sont de 1.84 et 1.74 fois (SF5) et 1.63 et 1.27 fois (MADO3) à 300 et 200 mM/NaCl. Il existe peu d'informations concernant l'effet du NaCl sur la production de l'AIA, celles qui existent en littérature analysent et étudient les effets du pH (Yurekli *et al.* 2003 ; Shirokikh *et al.*, 2007), de la température (Aldesuquy *et al.* 1998 ; Khamna *et al.*, 2010), des concentrations du L-tryptophane et des sources carbonées et azotées etc... (Ahmad *et al.*, 2005).

IV- Croissance de *Streptomyces* sp. MADO2 et *Nocardiosis* sp. MADO3 en milieux M63 et ISP5

IV-1. En absence de NaCl

Les caractéristiques de la croissance de *Streptomyces* sp. et de *Nocardiosis* sp. sont comparées sur milieux M63 et ISP5 (Fig. 9). *Streptomyces* sp. se développe mieux dans les deux milieux. La croissance de *Nocardiosis* sp. est plutôt optimale sur milieu M63.

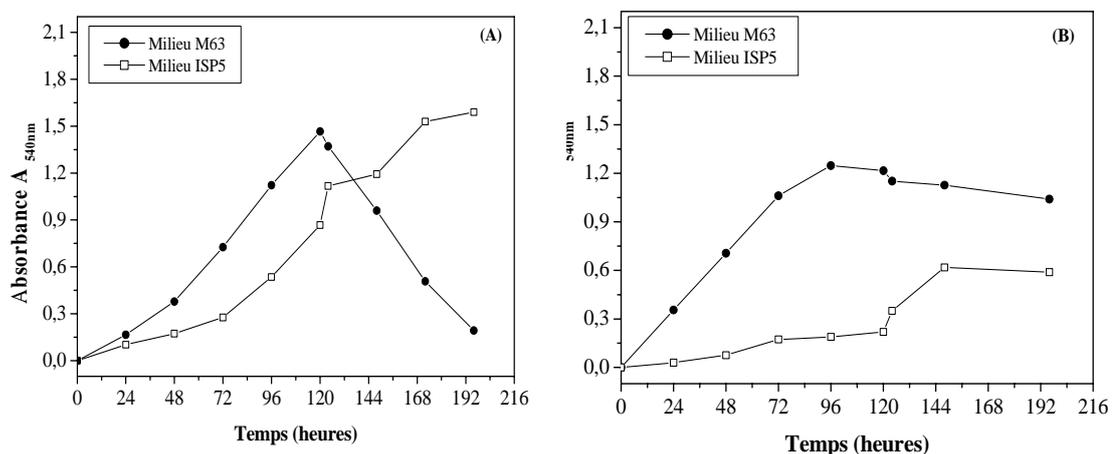


Fig. 9 : Croissance de *Streptomyces* sp. MADO2 (A) et *Nocardiosis* sp. MADO3 (B) cultivés sur milieux M63 et ISP5.

IV-2.Effet d'osmolarités élevées sur la croissance bactérienne

En présence de 0.5, 0.8 et 1M/NaCl, la croissance de *Streptomyces* sp. chute significativement sur milieux M63 et ISP5 (Fig.10). 0.5M/NaCl semble favorable à *Nocardioopsis* sp., au delà de cette teneur ; la croissance est inhibée (Fig. 11).

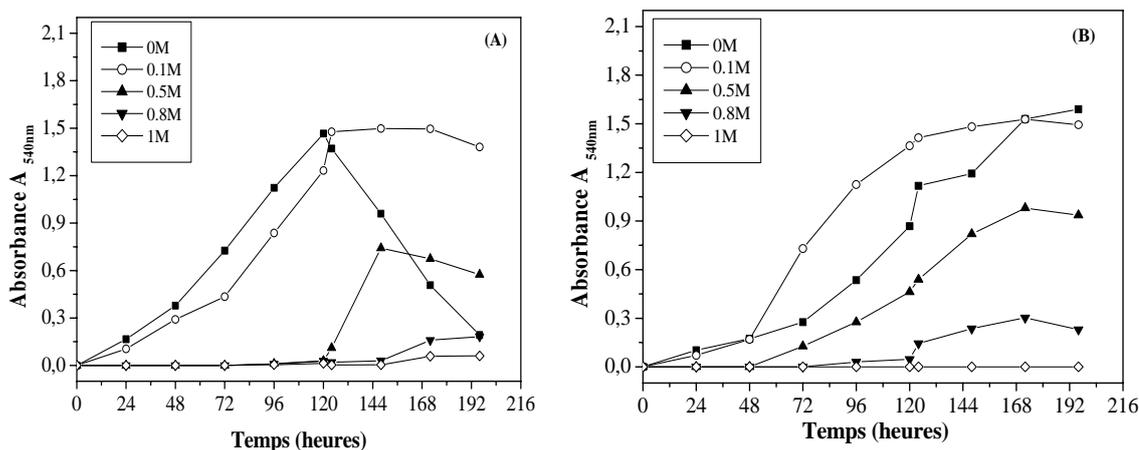


Fig. 10 : Croissance de *Streptomyces* sp. MADO2 en présence de NaCl sur milieux M63 (A) et ISP5 (B).

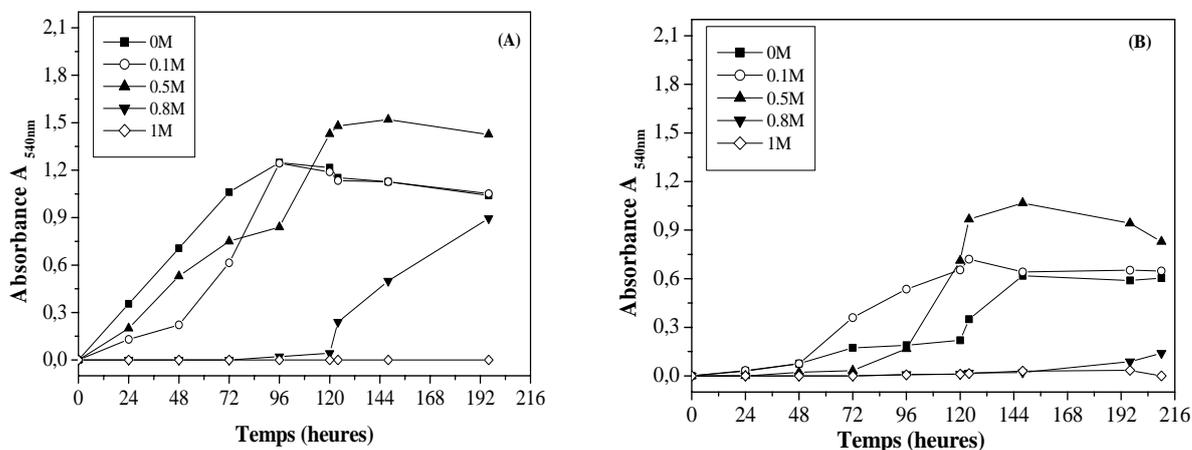


Fig. 11 : Croissance de *Nocardioopsis* sp. MADO3 en présence de NaCl sur milieux M63 (A) et ISP5 (B).

IV-3. Effet de la GB, de la proline et du tréhalose sur la croissance bactérienne en présence de différentes concentrations de NaCl

IV-3-1. En présence de 0.1 M/NaCl

En milieu M63+0.1 M/NaCl, l'apport de tréhalose améliore la croissance de *Streptomyces* sp. La GB et la proline l'inhibe. La réponse de *Nocardiosis* sp. à la GB et à la proline est totalement différente puisque la croissance est restaurée. En milieu ISP5 additionné d'osmoprotecteurs la croissance de *Streptomyces* sp. est inhibée. Elle stimulée par le tréhalose et la proline chez *Nocardiosis* sp. (Fig. 12 et 13).

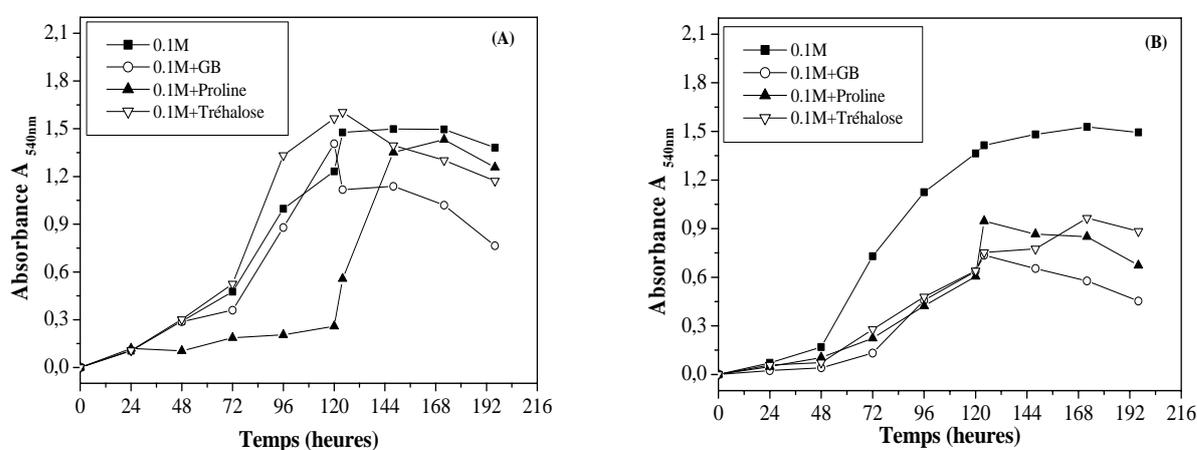


Fig. 12 : Croissance de *Streptomyces* sp. MADO2 sur milieux M63 (A) et ISP5 (B) en présence de 0.1 M/NaCl et/ou de GB de proline et de tréhalose (1 mM).

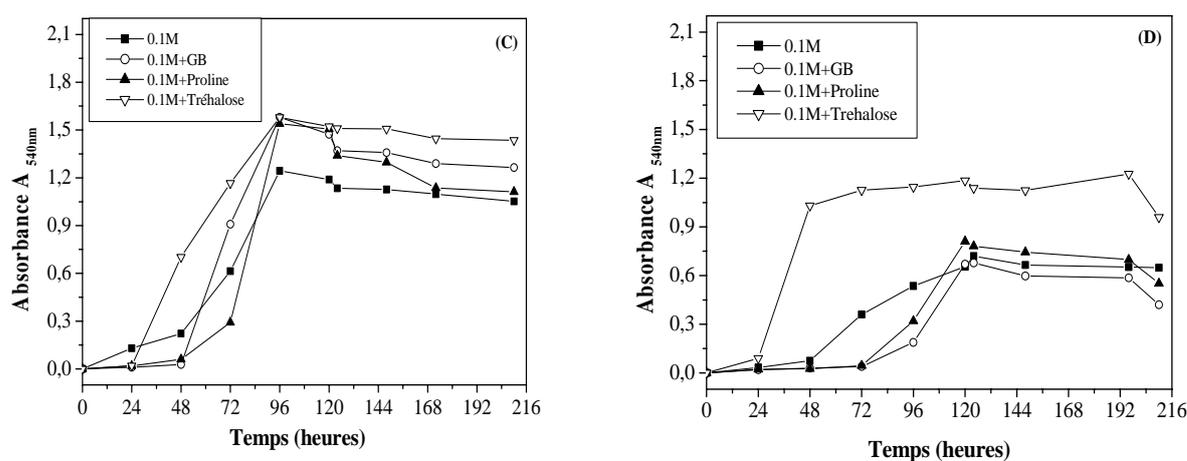


Fig. 13 : Croissance de *Nocardiosis* sp. MADO3 sur milieux M63 et ISP5 en présence de 0.1 M/NaCl et/ou de GB, de proline et de tréhalose (1 mM).

IV-3-2. En présence de 0.5 M/NaCl

En présence de 0.5 M/NaCl, M63 et ISP5 additionnés de GB, de proline et de tréhalose ont constitué des milieux favorables à la croissance de *Streptomyces* sp. Celle de *Nocardioopsis* sp. est relativement la même en M63 et/ou GB, elle est améliorée en présence de tréhalose et de proline. La GB et la proline inhibent le développement de *Nocardioopsis* sp. sur ISP5 alors que le tréhalose le stimule (Fig. 14 et 15)

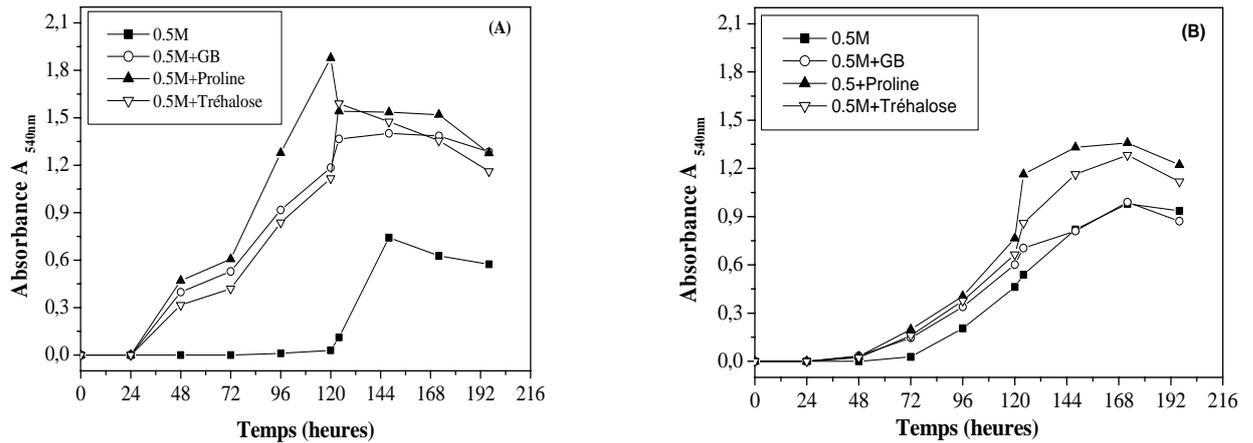


Fig. 14 : Croissance de *Streptomyces* sp. MAD02 sur milieux M63 (A) et ISP5 (B) en présence de 0.5 M/NaCl et/ou de GB de proline et de tréhalose (1 mM).

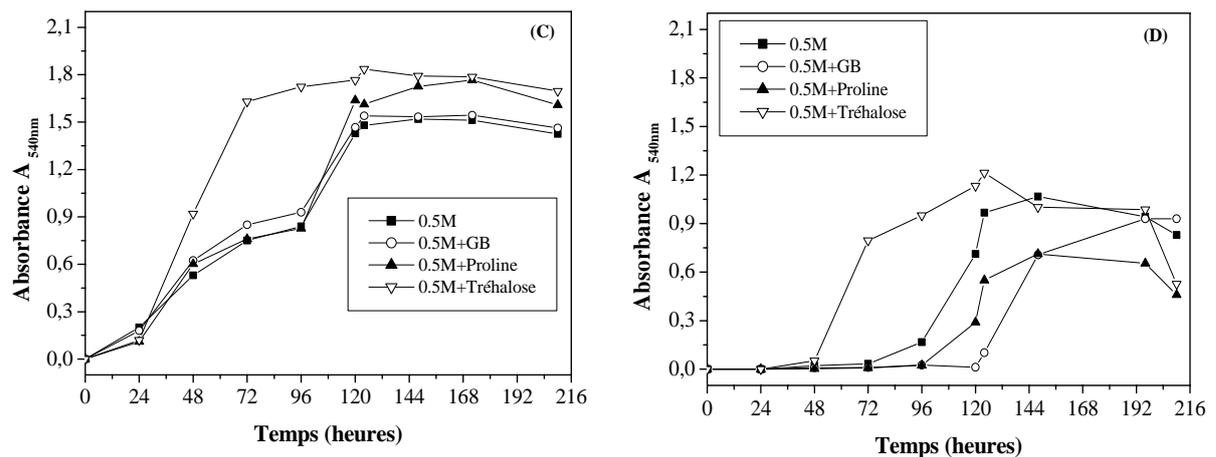


Fig. 15 : Croissance de *Nocardioopsis* sp. MAD03 sur milieux M63 (C) et ISP5 (D) en présence of 0.5 M/NaCl et/ou de GB de proline et de tréhalose (1 mM).

IV-3-3. En présence de 0.8 M/NaCl

Sur M63 additionné de 0.8M/NaCl, la GB, la proline et le tréhalose stimulent considérablement la croissance de *Streptomyces* sp. et *Nocardiopsis* sp. Toutefois, le tréhalose est plus efficace. Le développement de *Nocardiopsis* sp. est significativement amélioré par la GB sur ISP5 (Fig. 16 et 17).

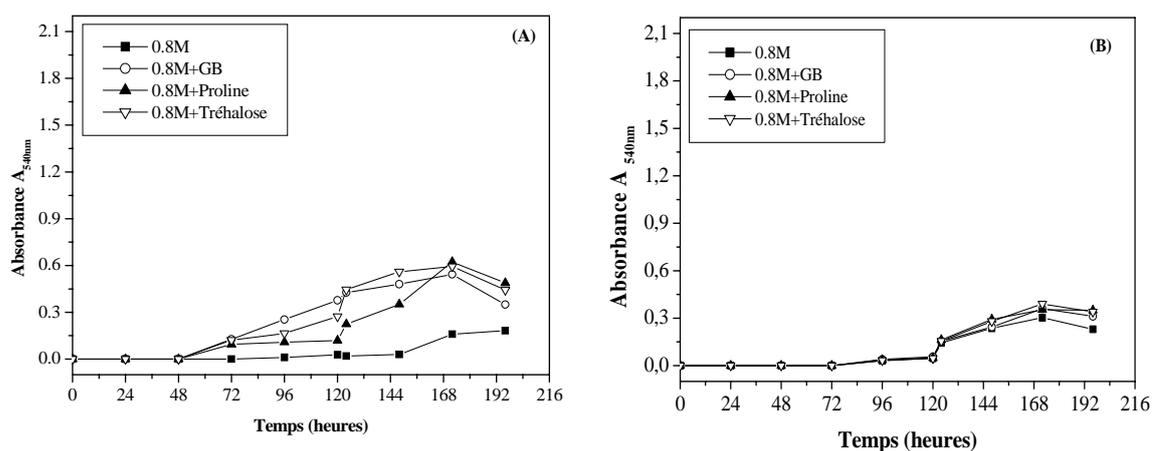


Fig. 16 : Croissance de *Streptomyces* sp. MADO2 sur milieux M63 (A) et ISP5 (B) en présence de 0.8 M/NaCl et/ou de GB, de proline et de tréhalose (1 mM).

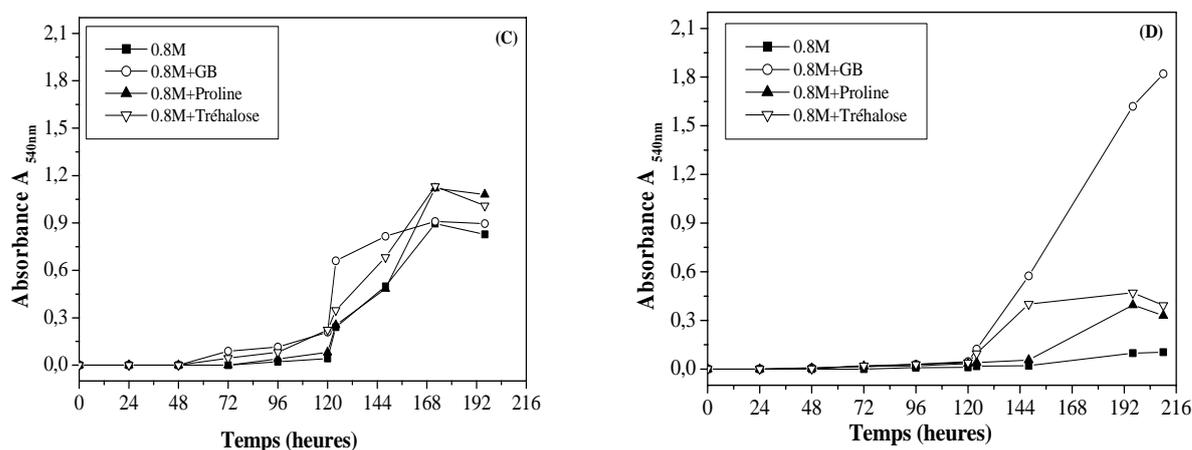


Fig. 17 : Croissance de *Nocardiopsis* sp. MADO3 sur milieux M63 (C) et ISP5 (D) en présence de 0.8 M/NaCl et/ou de GB de proline et de tréhalose (1 mM).

IV-3-4. En présence de 1 M/NaCl

En absence d'osmoprotecteurs, la croissance est légère ou absente respectivement chez *Streptomyces* sp. et *Nocardiopsis* sp. En M63+ NaCl/1M, la GB restaure efficacement le développement des deux souches par comparaison à la proline et le tréhalose. Elle exerce le même effet osmoprotecteur sur *Streptomyces* sp. en milieu ISP5. Cependant, son action est considérée comme négligeable pour *Nocardiopsis* sp. (Fig. 18 et 19).

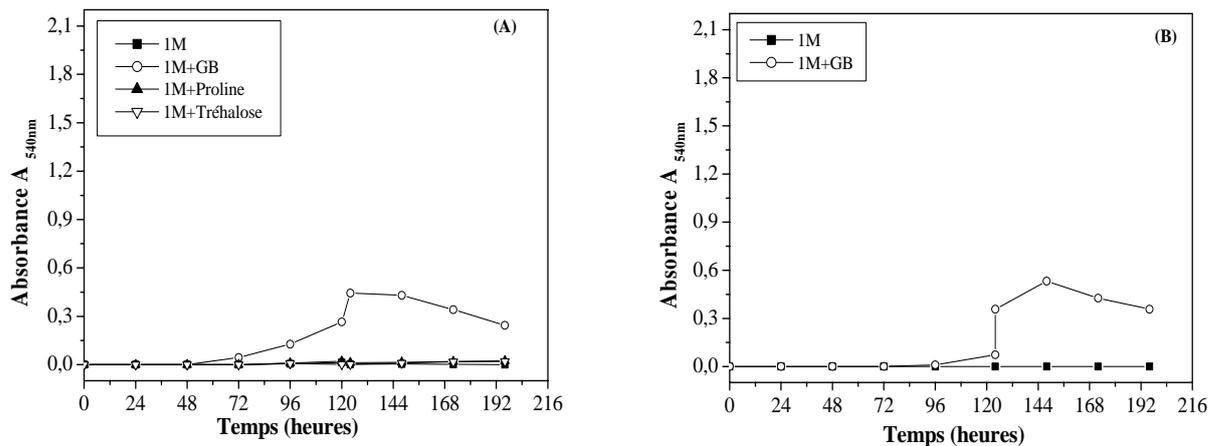


Fig. 18 : Croissance de *Streptomyces* sp. MADO2 sur milieux M63 (A) et ISP5 (B) en présence de 1 M/NaCl et/ou de GB de proline et de tréhalose (1 mM).

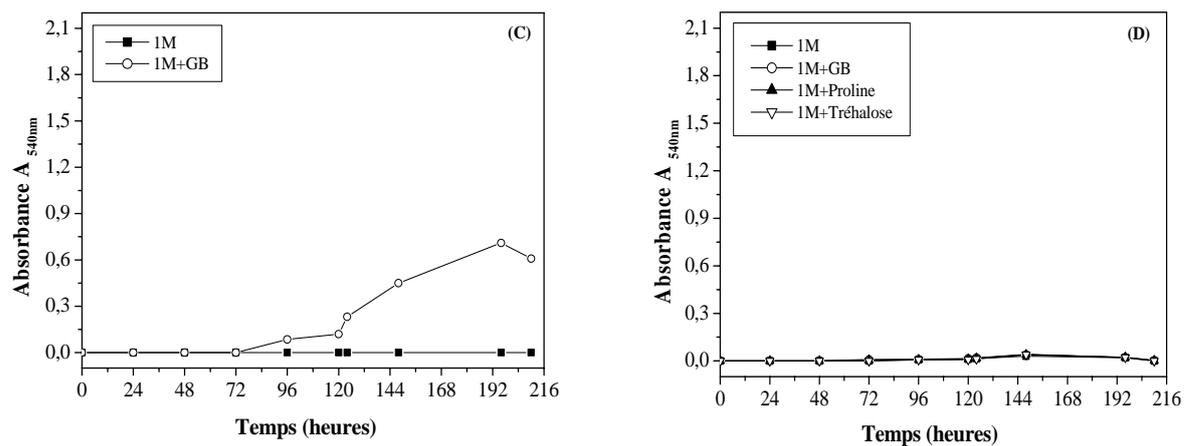


Fig. 19 : Croissance *Nocardiopsis* sp. MADO3 sur milieux M63 (C) et ISP5 (D) en présence de 1 M/NaCl et/ou de G.B de proline et de tréhalose (1 mM).

IV-4. Discussion

La réponse de *Streptomyces* sp. MADO2 et *Nocardiopsis* sp. MADO3 au stress salin est différente selon le type du milieu de culture utilisé et le degré de salinité (Tab. 19).

Tab. 19 : Comparaison du comportement de *Streptomyces* sp. et *Nocardiopsis* sp. vis-à-vis le NaCl sur milieux M63 et ISP en présence de GB, de proline et de tréhalose.

Souche bactérienne	NaCl (M)	M63	ISP5
<i>Streptomyces</i> sp. <i>Nocardiopsis</i> sp.	0	-Croissance optimale -Bonne croissance	-Croissance optimale -Croissance faible
<i>Streptomyces</i> sp. <i>Nocardiopsis</i> sp.	0.1	-Croissance inhibée (GB et proline), stimulée (tréhalose) -Croissance restaurée (GB, proline et tréhalose)	-Croissance inhibée (GB, proline et tréhalose) -Croissance restaurée (proline et tréhalose).
<i>Streptomyces</i> sp. <i>Nocardiopsis</i> sp.	0.5	-Croissance restaurée (GB, proline et tréhalose) -Croissance restaurée (proline et tréhalose)	-Croissance restaurée (GB, proline et tréhalose) -Croissance inhibée (GB et proline). Stimulée (tréhalose)
- <i>Streptomyces</i> sp. et <i>Nocardiopsis</i> sp.	0.8	-Croissance restaurée (GB, proline et tréhalose)	-Croissance restaurée (GB, proline et tréhalose)
<i>Streptomyces</i> sp. <i>Nocardiopsis</i> sp.	1	-La GB est plus efficace -La GB est plus efficace	-La GB est plus efficace en restaurant la croissance -Absence d'effet des trois osmoprotecteurs

En absence de NaCl, la croissance de *Streptomyces* sp. est optimale dans les deux milieux. Cependant, celle de *Nocardiopsis* sp. est plus favorable en milieu M63. D'après les résultats obtenus, *Streptomyces* sp. a utilisé les deux substrats (glucose et glycérol : ISP5) comme sources de carbone, tandis que *Nocardiopsis* sp., a assimilé favorablement le glucose - (M63). Selon Jignasha et Singh, (2007), la croissance de *Streptomyces clavuligerus* est faible sur milieu ISP5 par comparaison au milieu amidon-caséine. De plus, le glucose constitue la meilleure source de carbone par rapport au lactose, au maltose, au saccharose et au xylose. En présence d'osmolarités élevées, les deux souches se comportent comme des halophiles modérées. Les bactéries halophiles sont regroupées selon leurs exigences en sel. La méthode de classification proposée par Kashner, (1978) est la plus commune. *Streptomyces* sp. est plus sensible au stress salin que *Nocardiopsis* sp. dont l'optimum de croissance se situe à 0.5 M/NaCl, il exige une teneur de 3% de NaCl tandis que *Streptomyces* sp. a seulement besoin de 0.58% de NaCl.

En présence de 0.8 M/NaCl, le développement de *Streptomyces* sp. diminue fortement en milieu M63 par rapport au milieu ISP5. Les polyols (glycérol, arabitol et inositol) sont considérés comme étant les solutés compatibles typiques chez les champignons, les algues, les bactéries et les plantes halophiles et halotolérantes (da Costa *et al.*, 1998 ; Csonka et Hanson, 1991). La croissance de *Nocardiopsis* sp. est importante en milieu M63, ceci s'expliquerait par le fait que cette souche synthétise le tréhalose à partir du glucose. Il est à noter que le milieu M63 contient 10 mM/glucose, ceci permettrait aux cellules stressées d'accumuler le tréhalose comme osmoprotecteur. Selon McBride et Ensign, (1987), les spores de *Streptomyces griseus* cultivées sur milieu DMC contenant 200 mM et 20 mM de glucose accumulent respectivement 21% et 1.2% de leurs poids sec comme tréhalose. La relation entre la concentration du glucose dans un milieu et la teneur en tréhalose dans les spores est essentiellement linéaire entre 5 et 100 mM de glucose. Le tréhalose est largement retrouvé chez les procaryotes et les eucaryotes marins (croissance à 3% de NaCl, 0.5 mol/l) (da Costa *et al.*, 1998).

En présence de NaCl/1M, la croissance de *Streptomyces* sp. et *Nocardiopsis* sp. est totalement inhibée quel que soit le milieu. Elle est très faible chez *Streptomyces* sp. cultivé sur M63. Une osmoadaptation est acquise chez *Nocardiopsis* sp. en ISP5. Il est fort possible que les souches accumulaient des osmolytes afin de réguler leur réponse au stress osmotique.

Concernant l'effet osmoprotecteur de la GB, de la proline et du tréhalose, il est important de souligner que ces trois composés jouent un rôle critique comme osmolytes en présence d'osmolarités élevées ; cependant à de faibles osmolarités ils peuvent avoir un effet inhibiteur sur la croissance bactérienne. Malheureusement, peu d'informations existe sur la tolérance au NaCl, l'halophilisme et l'osmoadaptation des actinomycètes. D'autres recherches sont essentielles pour savoir comment ce groupe microbien répondent au stress salin et si leurs solutés compatibles sont les mêmes des bactéries halophiles (Wu et Chen, 1994).

Selon nos résultats, la GB a exercé un effet inhibiteur sur la croissance de *Nocardiosis* sp. en présence de NaCl/0.1M sur ISP5, cependant la proline et le tréhalose l'ont stimulé. La GB, la proline et le tréhalose ont le même effet sur *Streptomyces* sp. cultivé sur ISP5. Seulement la GB et la proline ont affecté négativement le développement de cette souche en M63.

La croissance de *Nocardiosis* sp. est aussi inhibée sur ISP5 en présence de NaCl/0.5M par l'addition de la GB et de la proline. Toutefois, l'effet osmoprotecteur de ces deux osmolytes ainsi que celui du tréhalose est également constaté sur le développement de *Streptomyces* sp. dans les deux milieux. L'action inhibitrice particulièrement de la GB et de la proline sur la croissance bactérienne dépend non seulement du degré de la salinité (osmolarité faible) mais aussi de la nature du milieu de culture. Les observations concernant l'effet inhibiteur de la GB, de la proline et du tréhalose sont identiques à celles rapportées par les travaux de Moleenar *et al.* (1993) ; Glaasker *et al.* (1996) et Kets *et al.* (1997) où la GB et d'autres osmoprotecteurs diminuent considérablement le nombre des cellules de *Lactococcus lactis*.

La capacité osmoprotectrice de la GB, de la proline et du tréhalose est seulement observée lorsqu'il s'agit de salinités inhibitrices. La proline est le soluté compatible le plus commun chez *Streptomyces* sp. (NaCl/0.5M) cultivé en milieux M63 et ISP5. Sous stress salin, la GB et la proline sont considérées comme les osmolytes organiques majeurs accumulées chez les plantes (Ashraf et Foolad, 2007) et d'autres organismes (Csonka, 1989). Chez *Salmonella oranienburg*, l'apport exogène de proline pourrait lever l'inhibition de la croissance causée par le stress osmotique (Csonka, 1989). Cet osmolyte est accumulé en quantités importantes dans des conditions de stress salin chez *Streptomyces* sp. (da Costa *et al.*, 1998). D'un autre côté, l'addition de 12.5 mM de proline

dans un milieu de culture augmente le taux de croissance chez *Streptomyces griseus* (Killham, 1948b).

En présence de NaCl/0.8M, le tréhalose confère une osmoadaptation pour *Streptomyces* sp. dans les deux milieux de culture, il stimule efficacement la croissance de *Nocardiopsis* sp. Le tréhalose est largement connu par son pouvoir de stabiliser les membranes, les protéines et la paroi cellulaire dans des conditions de déshydratation (da Costa *et al.*, 1998 ; Xu *et al.*, 1998).

Les résultats obtenus confirment l'osmoprotection apportée par la GB pour *Streptomyces* sp. et *Nocardiopsis* sp. A ce jour, elle est l'osmoprotecteur le plus puissant (Singh *et al.*, 2009) pour la plupart des microorganismes (Imhoff et Rodriguez-Valera, 1984). Le transport et l'accumulation de la GB sont déclenchés par l'élévation de la pression osmotique du milieu extérieur (Le Rudulier et Bouillar, 1983 ; Perroud et Le Rudulier, 1985 et May *et al.*, 1986). La GB est généralement considérée comme le principal osmolyte pour *E. coli* car elle augmente la tolérance aux sucres, aux sels et aux acides organiques (Csonka, 1989 ; Csonka et Hanson, 1991 ; Miller et Ingram, 2007).

V- Effet du sel et/ou *S. vermiculata* sur la croissance de *Streptomyces* sp. SF5 et de *Streptomyces* sp. MAD02

Cette étude a pour objectif d'examiner l'effet du NaCl (0, 100, 500, 800 et 1000mM) et/ou de *S. vermiculata* sur la croissance de *Streptomyces* sp. SF5 et de *Streptomyces* sp. MAD02 dans deux milieux de culture (M63 et ISP5) (Fig. 20 et 21).

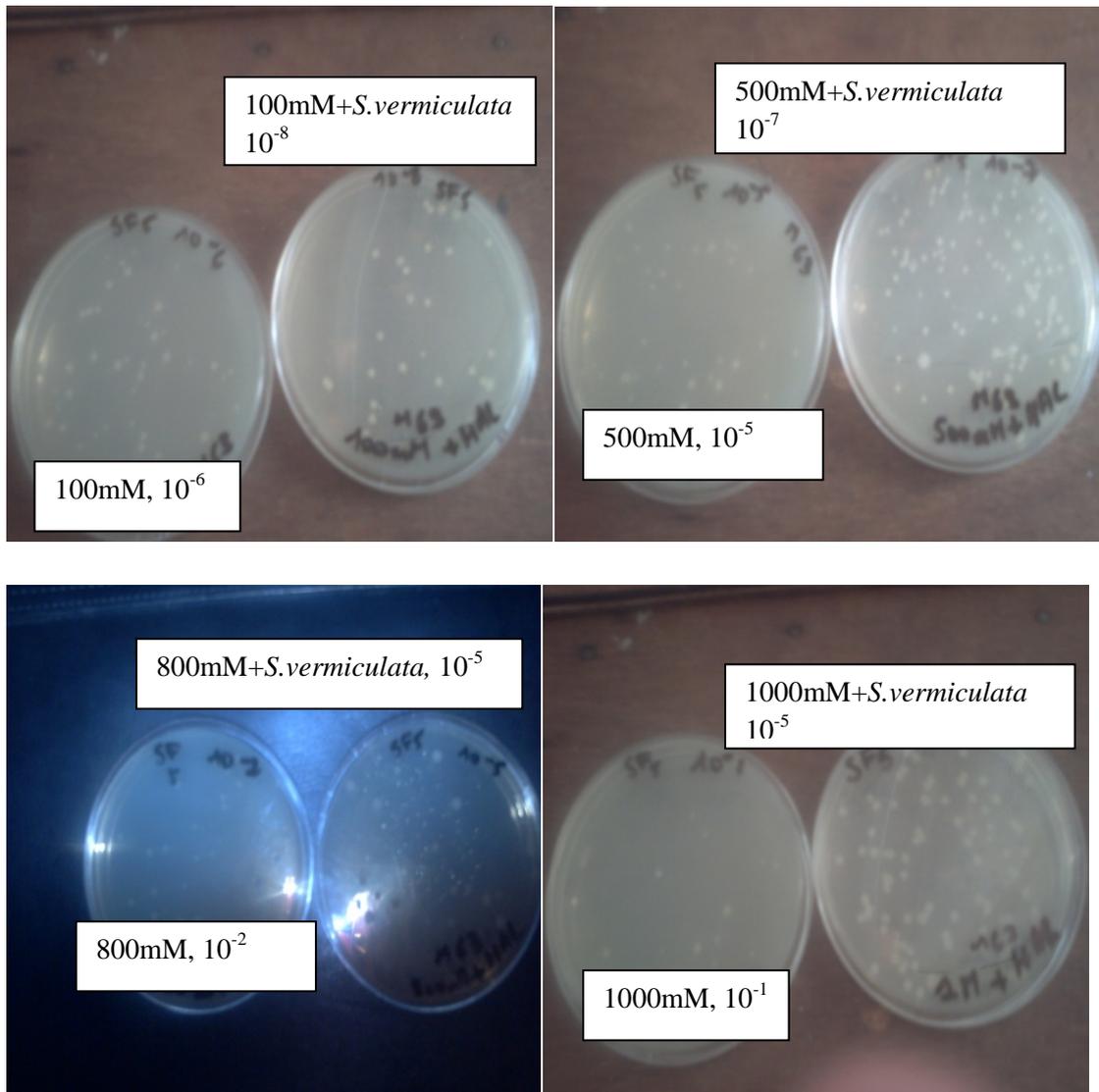


Fig. 20 : Restauration de la croissance de *Streptomyces* sp.SF5 par *S. vermiculata* en présence de NaCl (100, 500, 800 et 1000mM) en M63.

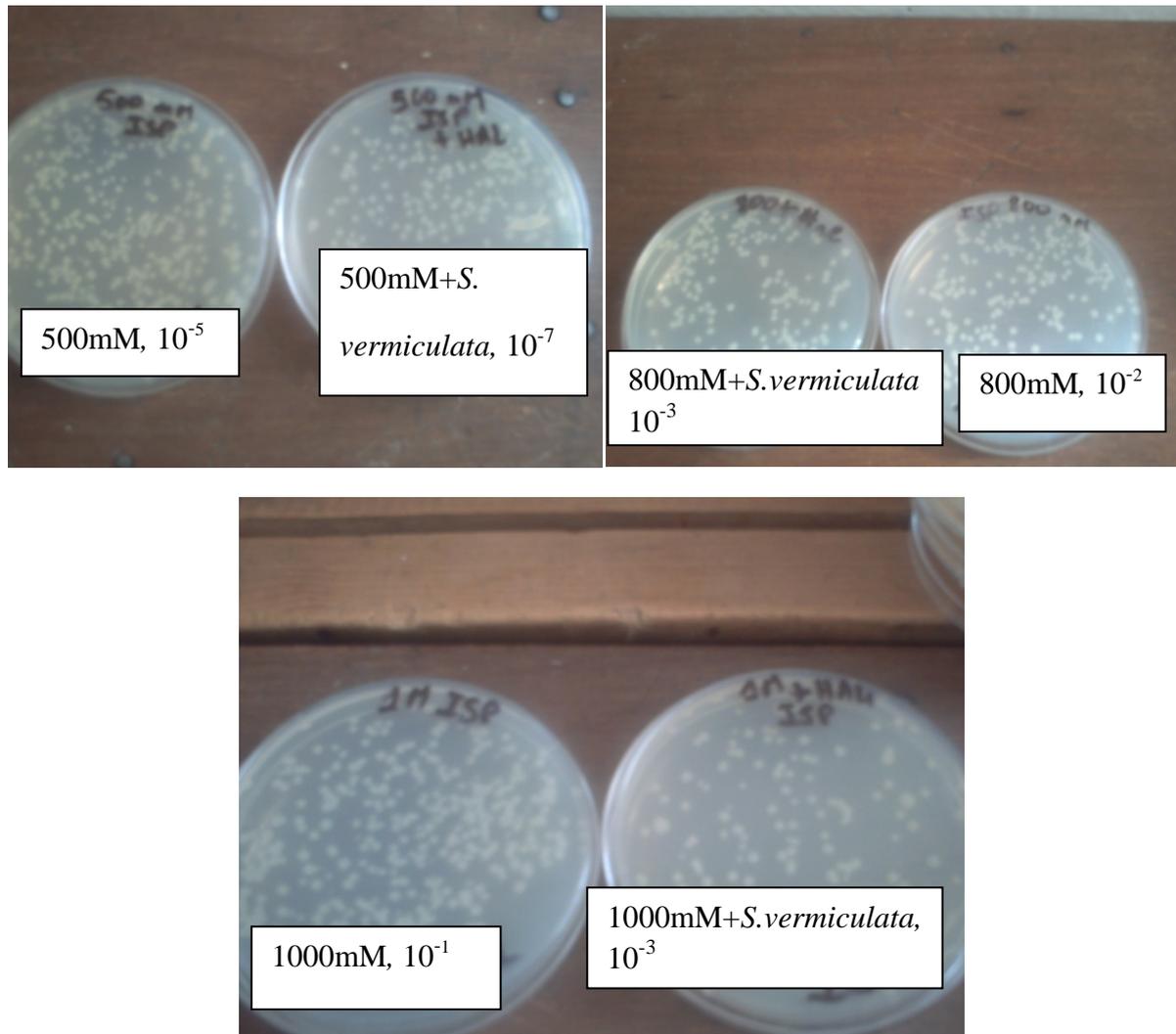


Fig. 21 : Restauration de la croissance de *Streptomyces* sp.SF5 par *S. vermiculata* en présence de NaCl (500, 800 et 1000mM) en ISP5.

V-1. Croissance de *Streptomyces* sp.SF5 en M63

S. vermiculata améliore sensiblement la croissance de *Streptomyces* sp. SF5 en absence et en présence de sel, l'effet est mieux apprécié sous stress salin. En présence de NaCl (800 et 1000mM/NaCl), les numérations bactériennes sont respectivement de $3.4 \cdot 10^4$ et $2.5 \cdot 10^3$ UFC/ml. *S. vermiculata* stimule la croissance par 3 Log ($2.2 \cdot 10^7/800\text{mM}$ et $9 \cdot 10^6$ UFC/ml/1000mM) (Fig. 22).

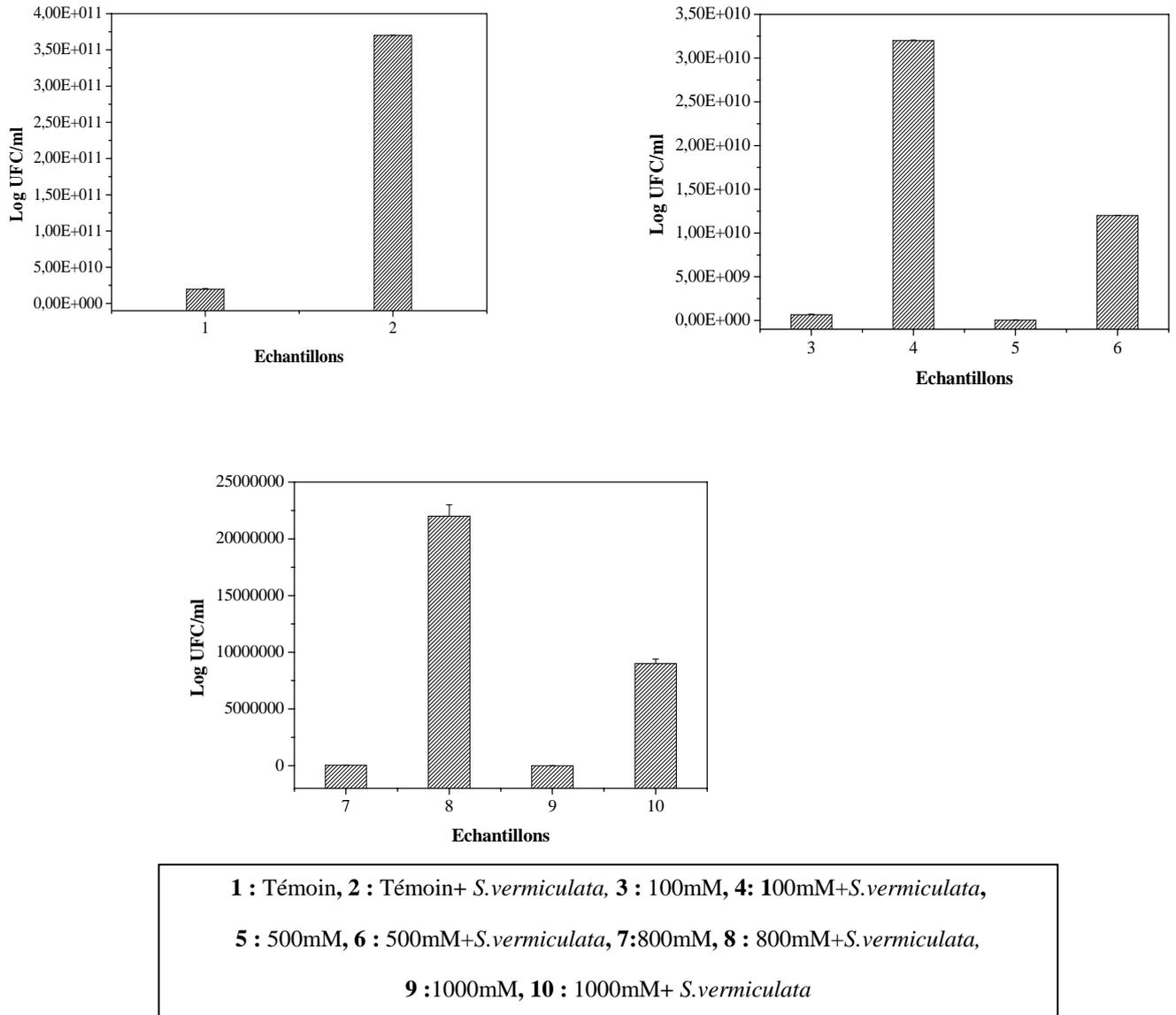
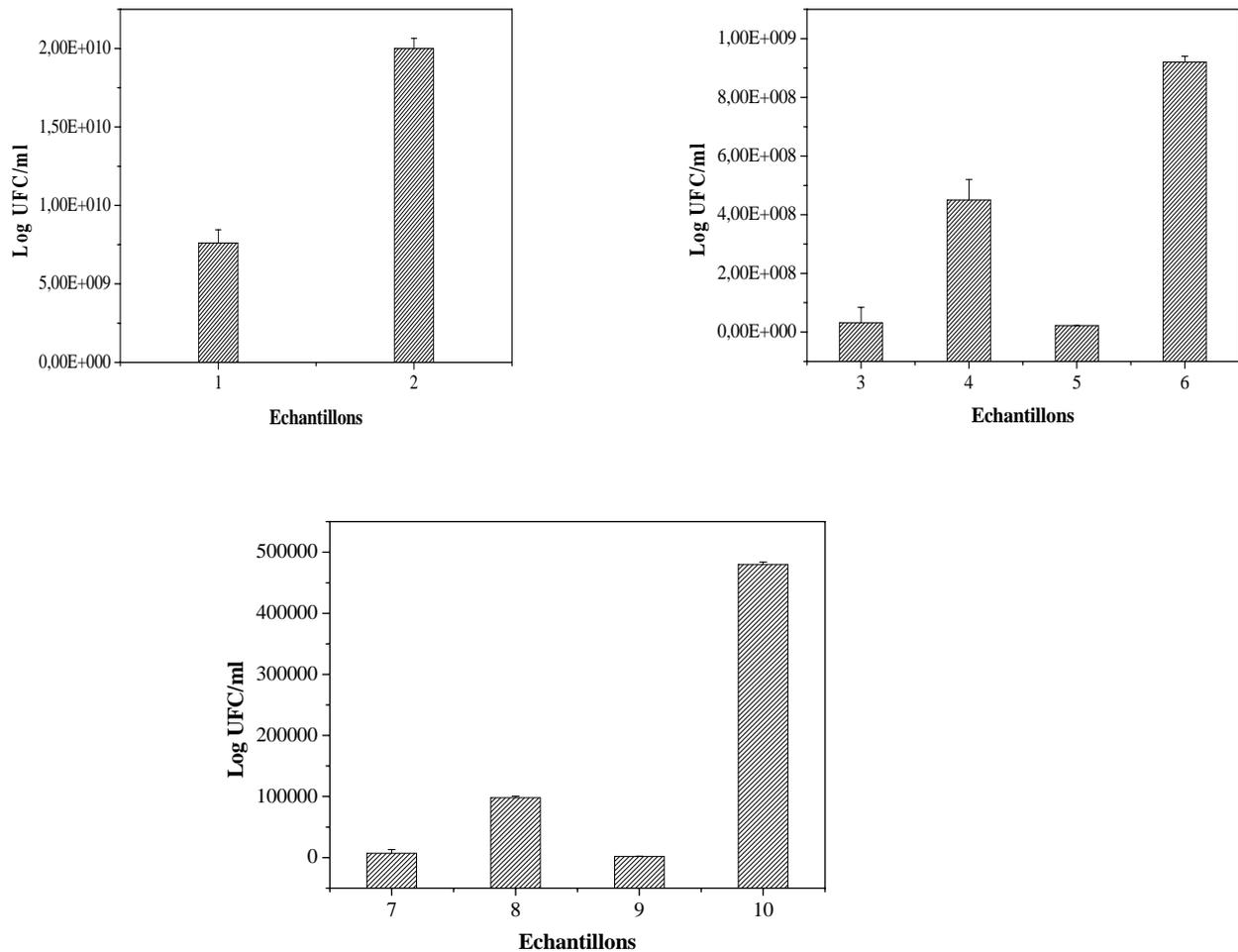


Fig. 22: Effet de *S. vermiculata* sur la croissance de *Streptomyces* sp. SF5 en présence de NaCl cultivé en M63.

V-2. Croissance de *Streptomyces* sp.SF5 en ISP5

En présence de NaCl/800 et 1000mMl, les numérations sont respectivement de $2.2 \cdot 10^3$ et $2 \cdot 10^3$ UFC/ml. Celles-ci grimpent à $2,2 \cdot 10^5$ et $4.8 \cdot 10^5$ UFC/ml en présence de *S. vermiculata* (Fig. 23)

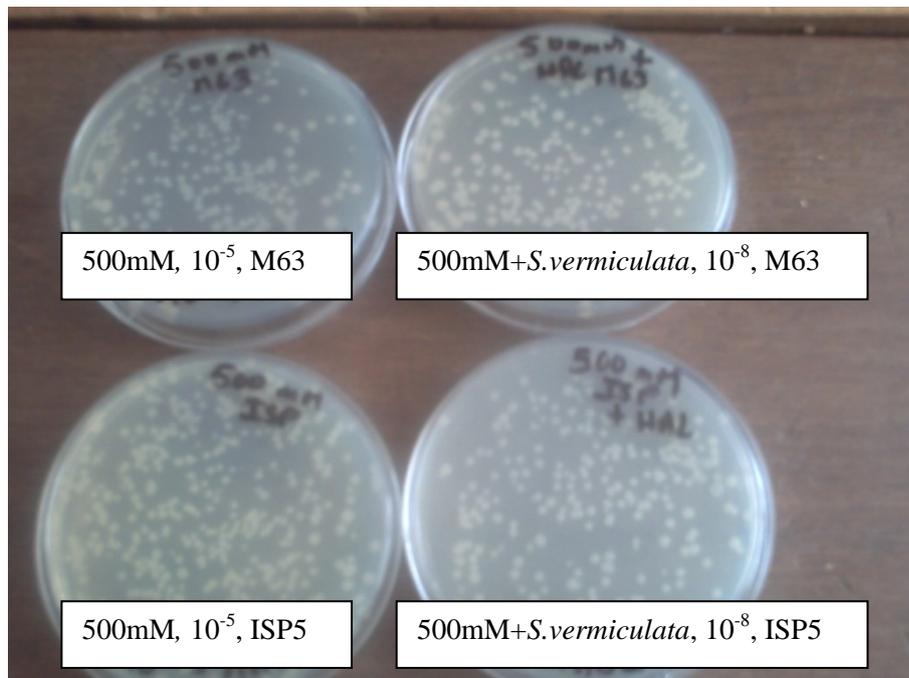
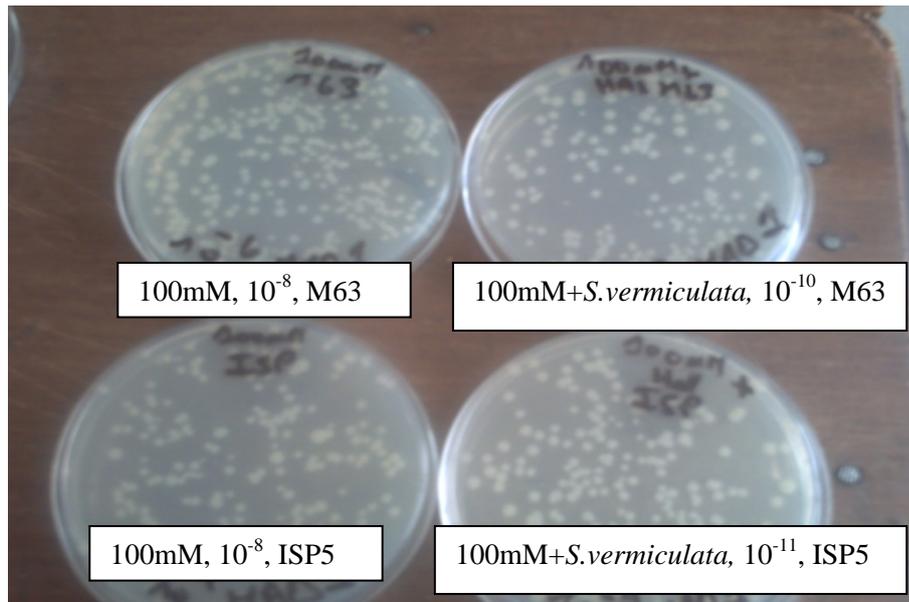


1 : Témoin, 2 : Témoin+ *S.vermiculata*, 3 : 100mM, 4: 100mM+*S.vermiculata*, 5 : 500mM,
6 : 800mM+*S.vermiculata*, 7:800mM, 8 : 800mM+*S.vermiculata* ,9 :1000mM, 10 : 1000mM+ *S.vermiculata*

Fig. 23 : Effet de *S. vermiculata* sur la croissance de *Streptomyces* sp. SF5 en présence de NaCl cultivé en ISP5.

V-3. Croissance de *Streptomyces* sp.MADO2 en M63

La croissance de *Streptomyces* sp. MADO2 est sensiblement améliorée par l'addition d'halophyte dans les deux milieux (Fig. 24). Cependant, l'action stimulatrice est plus accentuée en présence de sel. A NaCl/1000mM, les numérations sont de $2 \cdot 10^4$ UEC/ml. L'addition de *S.vermiculata* permet de multiplier le nombre de 2 Log ($3,9 \cdot 10^6$ UFC/ml). Celui-ci est augmenté par plus de 4 Log à 500mM/NaCl (de $2,5 \cdot 10^7$ UFC/ml à $1,35 \cdot 10^{11}$ UFC/ml) (Fig. 25).



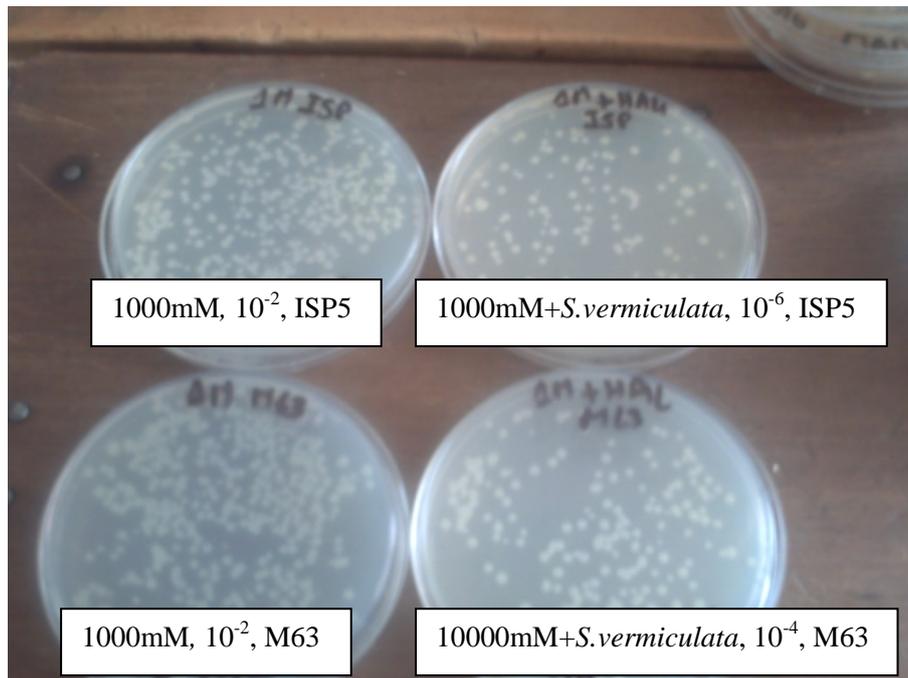
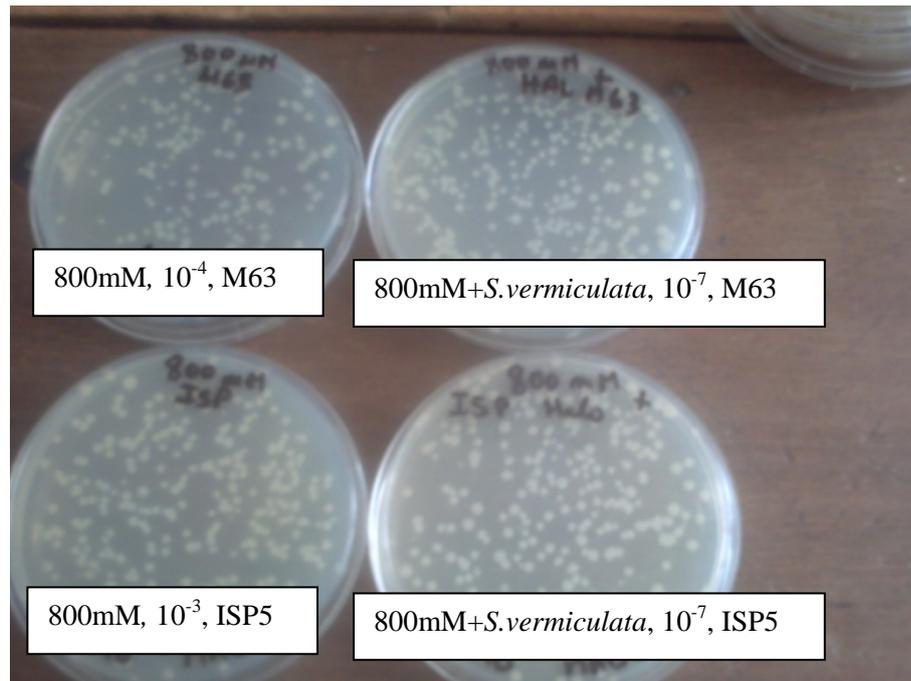


Fig. 24 : Restauration de la croissance de *Streptomyces* sp.MADO2 par *S. vermiculata* en présence de NaCl (100, 500, 800 et 1000mM) en milieux M63 et ISP5.

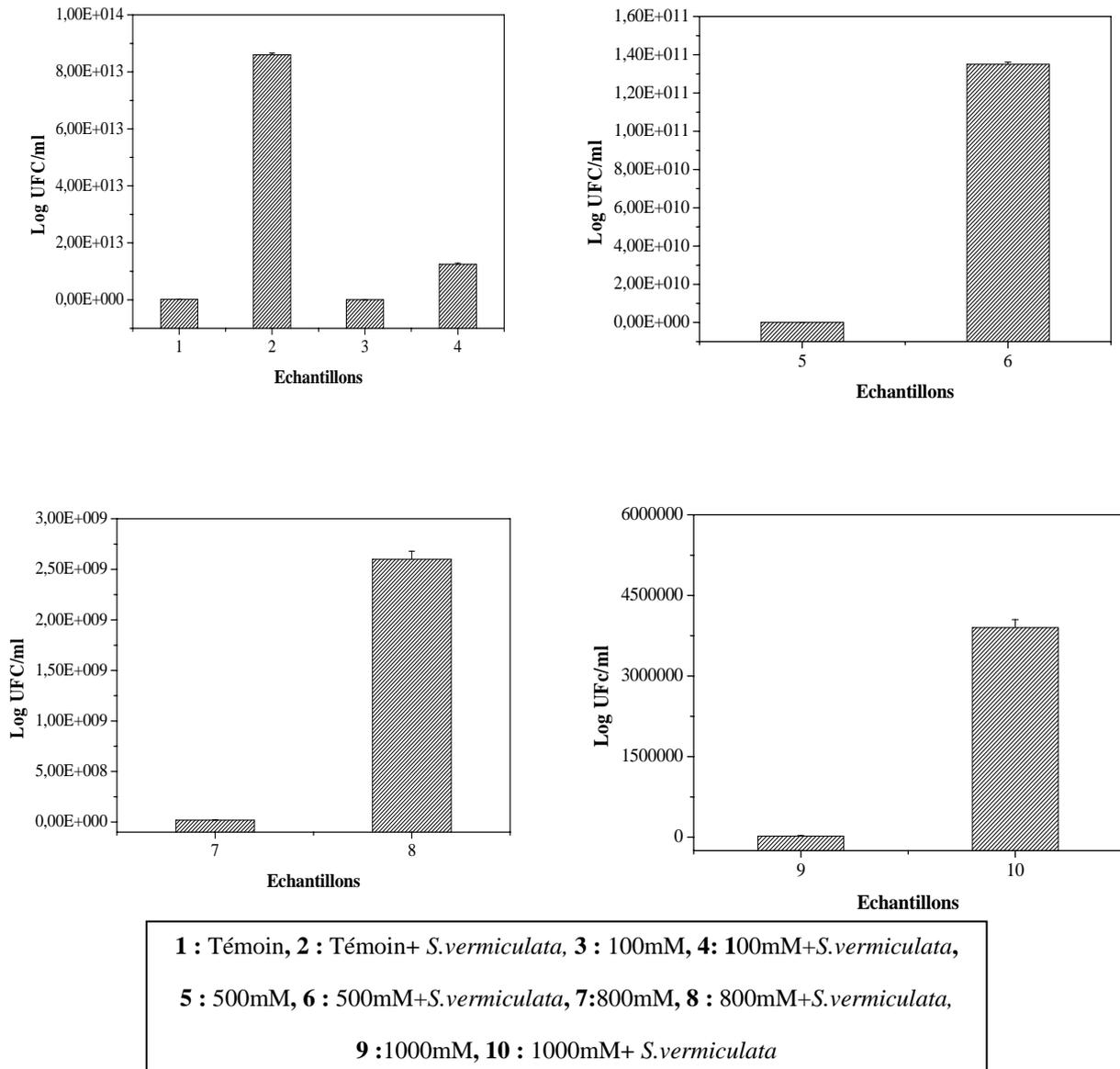


Fig. 25 : Effet de *S. vermiculata* sur la croissance de *Streptomyces* sp. MADO2 en présence de NaCl en M63.

V-4. Croissance de *Streptomyces* sp.MADO2 en ISP5

Les numérations de *Streptomyces* sp. MADO2 à 1000mM/NaCl sont de 7.10^4 UFC/ml, elles atteignent 3.10^9 UFC/ml en présence d’halophyte. La croissance est également améliorée en présence de 800mM/NaCl (de $2,5.10^5$ UFC/ml à 4.10^9 UFC/ml) (Fig. 26).

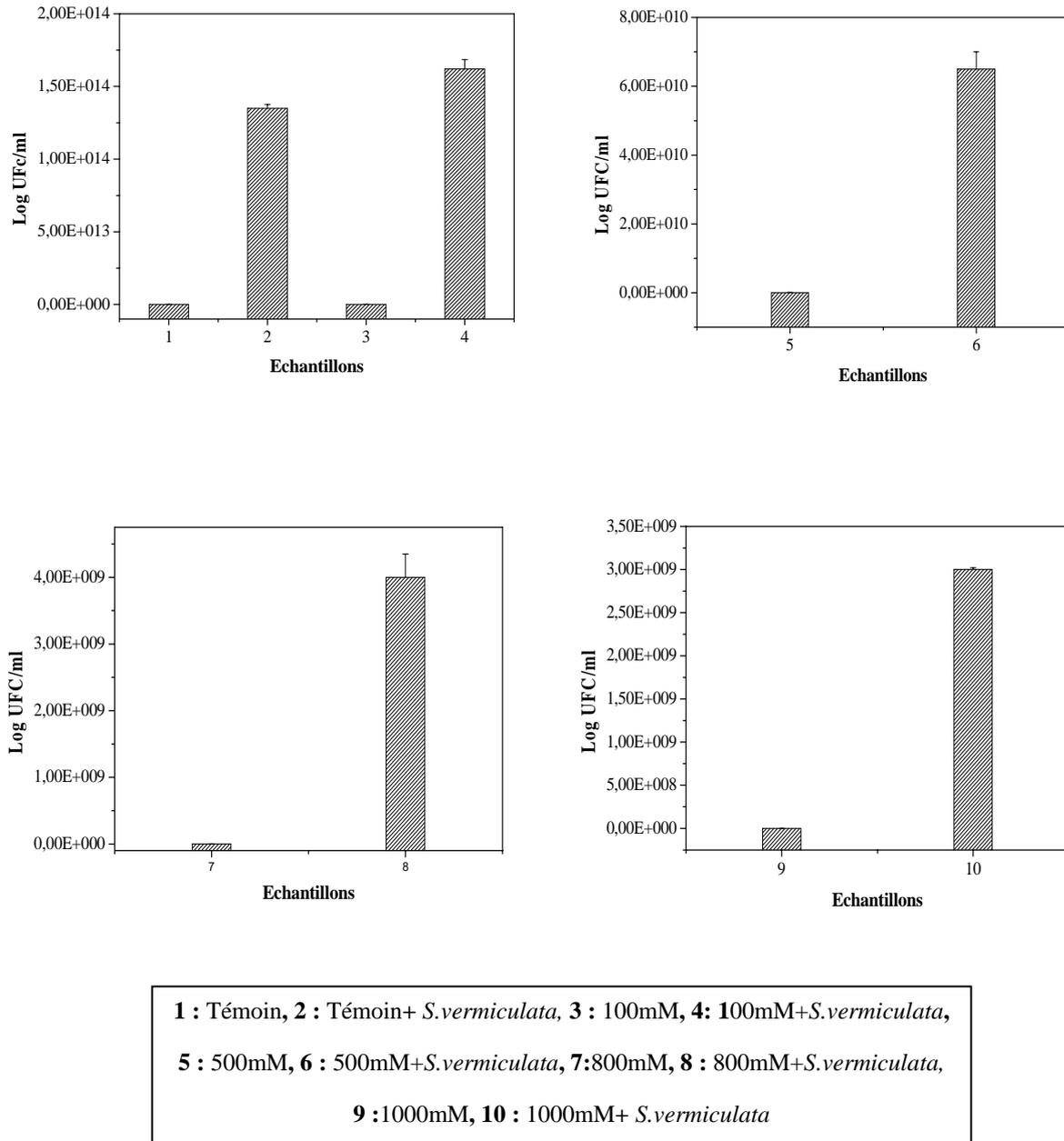


Fig. 26 : Effet de *S. vermiculata* sur la croissance de *Streptomyces* sp. MADO2 en présence de NaCl en ISP5.

VI- Effet du sel sur la croissance de *Streptomyces* sp. SF5 en milieux M63 et ISP5 en présence de GB, de proline, de tréhalose et de *S. vermiculata*

VI-1. En présence de NaCl sans apport d'osmoprotecteurs

Streptomyces sp. SF5 se développe favorablement en ISP5 par rapport au M63. La croissance est améliorée (x3.22 et x1.65) sur témoin et à NaCl (0.5M) en milieux ISP5 (0.988-0.161) et M63 (0.305-0.097) après sept jours d'incubation (Fig. 27).

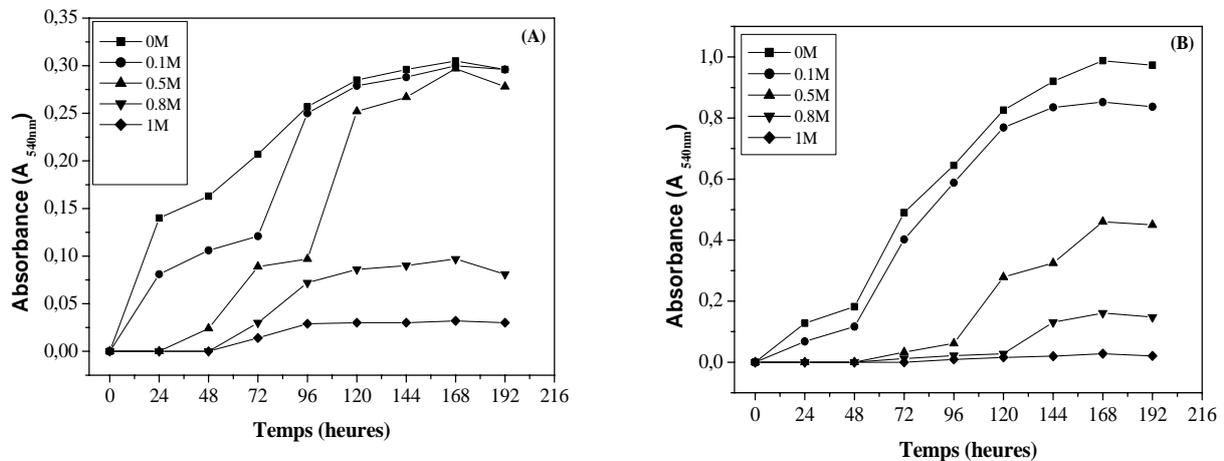


Fig. 27 : Croissance de *Streptomyces* sp. SF5 en présence de concentrations croissantes de NaCl en milieux M63 (A) et ISP5 (B).

VI-2. Effet du sel, de GB, de proline, de tréhalose et de *S. vermiculata* sur la croissance bactérienne

VI-2-1. En absence de NaCl

La croissance bactérienne est sensiblement améliorée sur M63 (3.44 et 2.39) par rapport au ISP5 (x1.19 et x1.16) par l'addition de *S. vermiculata* et de GB. De même la proline et le tréhalose exercent un effet similaire sur le développement bactérien (Fig. 28).

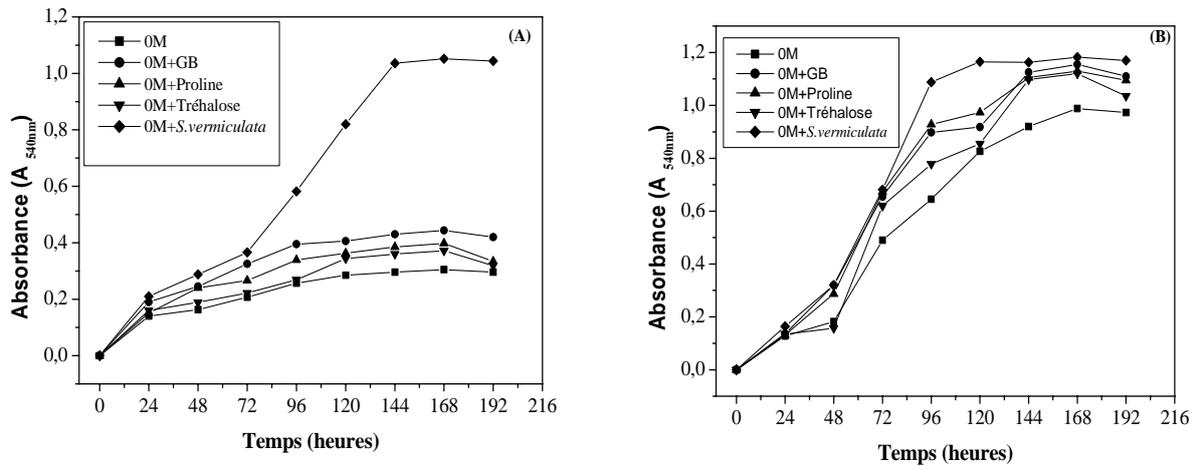


Fig. 28 : Croissance de *Streptomyces* sp. SF5 en milieux M63 (A) et ISP5 (B) en absence de NaCl et/ou GB, proline, tréhalose (1 mM) et *S. vermiculata*.

VI-2-2. En présence de 0.1 M/NaCl

A 0.1M/NaCl, la croissance diminue faiblement sur milieux M63 et ISP5. *S.vermiculata* l’améliore (3fois) en M63 par comparaison au ISP5 (1.36 fois). La même action osmoprotectrice est constatée avec la GB, la proline et le tréhalose. Cependant, ces trois osmolytes agissent négativement sur la croissance bactérienne en ISP5 (Fig. 29).

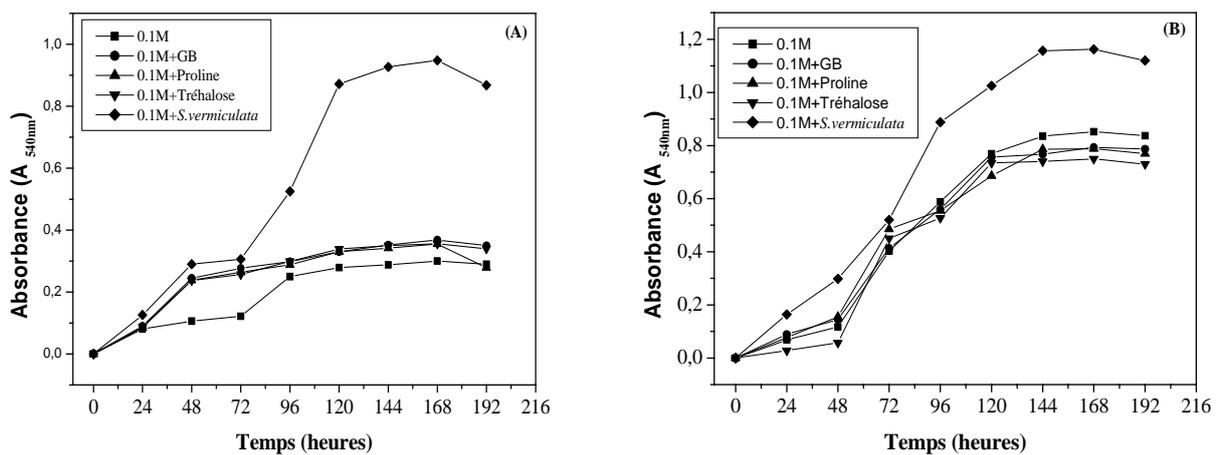


Fig. 29 : Croissance de *Streptomyces* sp. SF5 en présence de 0.1M/NaCl en milieux M63 (A) et ISP5 (B) et/ou GB, proline, tréhalose (1 mM) et *S. vermiculata*.

VI-2-3. En présence de 0.5 M/NaCl

S.vermiculata améliore efficacement la croissance de *Streptomyces* sp. SF5 en milieux M63 (2.44 fois) et ISP5 (1.72 fois). La GB, la proline et le tréhalose restaurent le développement bactérien dans les deux milieux de culture (Fig. 30).

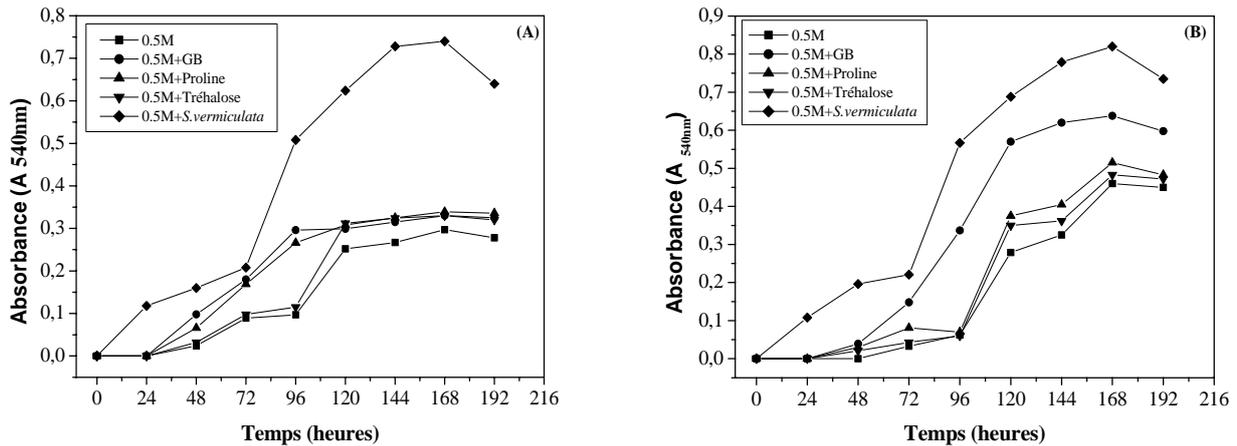


Fig. 30 : Croissance de *Streptomyces* sp. SF5 en présence de 0.5M/NaCl en milieux M63 (A) et ISP5 (B) et/ou GB, proline, tréhalose (1 mM) et *S. vermiculata*

VI-2-4. En présence de 0.8 M/NaCl

La croissance bactérienne est diminuée respectivement en milieux M63 et ISP5 par des facteurs de 3.14 et 6.13 fois. *S. vermiculata* améliore efficacement les numérations en M63 (5.87 fois) et ISP5 (3.68 fois). Notons que l'effet osmoprotecteur est aussi observé avec la GB, la proline et le tréhalose mais à des degrés différents et selon le milieu de culture (Fig. 31).

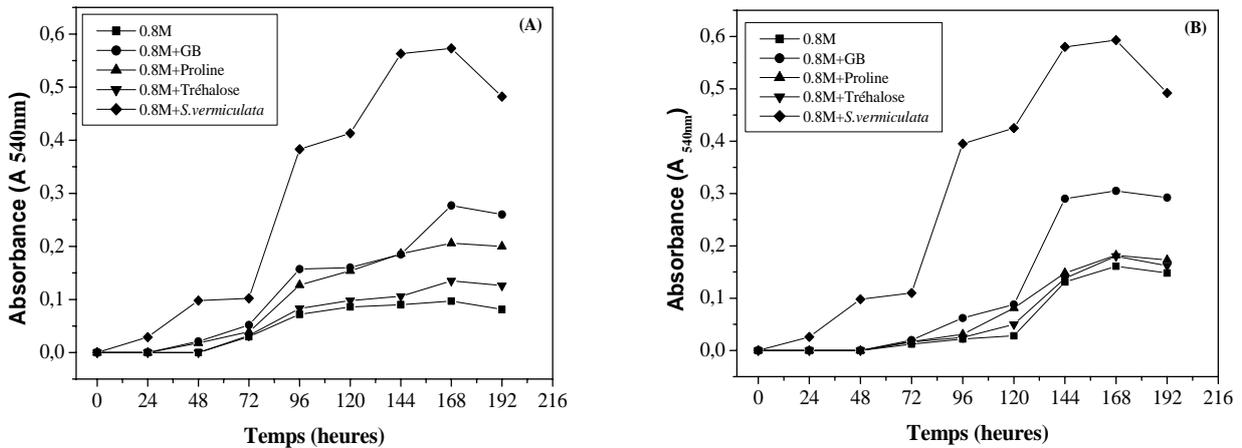


Fig. 31 : Croissance de *Streptomyces* sp. SF5 en présence de 0.8M/NaCl en milieu M63 (A) et ISP5 (B) et/ou GB, proline, tréhalose (1 mM) et *S. vermiculata*.

VI-2-5. En présence de 1M/NaCl

L'effet inhibiteur du NaCl est prononcé à 1M, la croissance est diminuée sur milieu M63 et ISP5 (9.53 et 35.28 fois). *S. vermiculata* restaure le développement de *Streptomyces* sp. SF5 (11.68 et 15.53 fois). Les trois osmoprotecteurs restaurent la croissance bactérienne, cependant la GB est plus performante (Fig. 32).

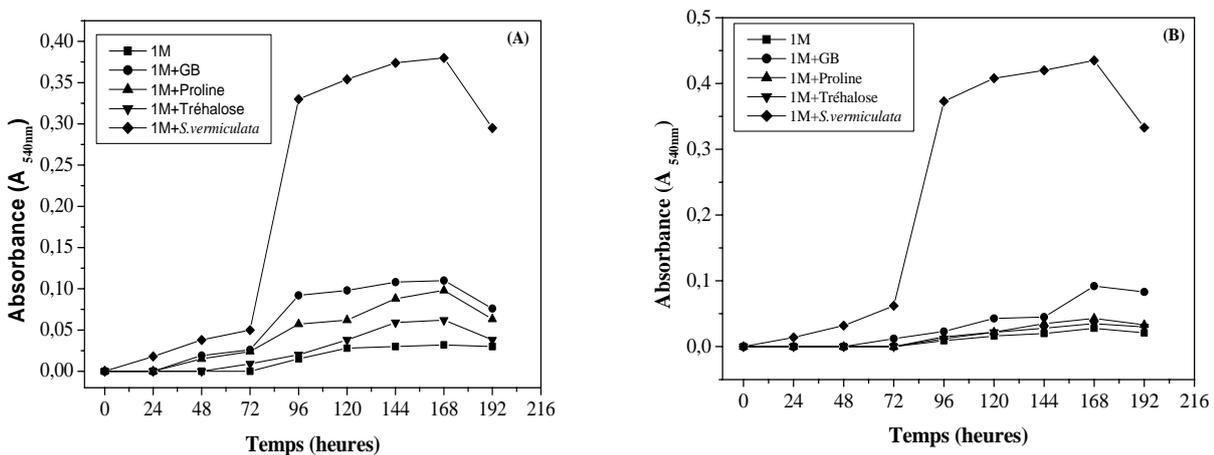


Fig. 32 : Croissance de *Streptomyces* sp. SF5 en présence de 1M/NaCl en milieu M63 (A) et ISP5 (B) et/ou GB, proline, tréhalose (1mM) et *S. vermiculata*.

VI-3. Discussion

Le potentiel effet de *S. vermiculata*, de la GB, de la proline et du tréhalose sur la restauration de la croissance bactérienne, est évident. Le NaCl à diverses teneurs ralentit fortement le développement de *Streptomyces* sp. SF5 et de *Streptomyces* sp. MADO2. Toutefois, cette action est proportionnelle au degré de la salinité et dépend de l'espèce bactérienne et le milieu de culture.

Streptomyces sp. SF5 préfère le glucose (M63) comme source de carbone. Les numérations sont de $6.8 \cdot 10^7$, $3.9 \cdot 10^7$, $3.4 \cdot 10^4$ et $2.5 \cdot 10^3$ UFC/ml respectivement à 100, 500, 800, et 1000mM/NaCl. Le milieu ISP5, a permis de réajuster la croissance mais les numérations restent moins importantes à celles observées avec le milieu M63 ($3.2 \cdot 10^7$, $2.2 \cdot 10^7$, $7.2 \cdot 10^3$ et $2 \cdot 10^3$ UFC/ml). La croissance de *Streptomyces* sp. MADO2 est similaire dans les deux milieux, il semble que cette souche utilisait le glucose et le glycérol comme sources de carbone contrairement à *Streptomyces* sp. SF5 où le glucose constitue la source de carbone préférée. Selon Jignasha et Singh (2007), chez *Streptomyces clavuligerus*, le glucose est assimilé favorablement par comparaison au lactose, au maltose, au saccharose et au xylose.

Le NaCl diminue significativement la croissance bactérienne principalement à de fortes osmolarités (800mM et 1000mM). La survie est expliquée d'une part par le fait que les deux souches ont synthétisé des solutés compatibles. En réponse aux osmolarités élevées, les microorganismes accumulent des acides aminés (glutamate et proline), des sucres (tréhalose, saccharose et glycérol) et des composés-oniums (glycine bétaine et diméthylsulfopropionate – DMSP-) (Cohen et Rickenberg, 1956 ; Csonka, 1989). Les mécanismes d'osmorégulation sont essentiels pour la division et la croissance cellulaire (Lucht et Bremer, 1994), ils sont identiques chez tous les organismes (plantes, animaux et bactéries) (Gouffi *et al.*, 2000). D'autre part, une teneur de 10mM de glucose (M63) restaure également le développement et permet aux cellules stressées d'accumuler le tréhalose comme osmoprotecteur. Les spores de *Streptomyces griseus* cultivées sur milieu DMC contenant 200mM de glucose contiennent 21% de leurs poids sec en tréhalose (McBride and Ensign, 1987), ceci explique la relation entre le glucose et tréhalose synthétisé comme osmoprotecteur. L'accumulation de cet osmolyte a été rapportée chez de nombreuses espèces bactériennes (*Rhizobium*, *Pseudomonas* et *Azospirillum*) (Miller et Wood, 1996). De plus, le glycérol (ISP5) osmoprotège les deux bactéries, les polyols sont considérés les solutés compatibles chez les champignons halophiles

et halotolérants, les algues et les plantes (da Costa *et al.*, 1998). *Debaromyces hanseii* (levure halotolérante) et *Dunaliella* (algue eucaryote) répondent au stress salin par la production et l'accumulation du glycérol (Le Rudulier, 1993). La croissance de *Streptomyces* sp.SF5 et *Streptomyces* sp.MADO2 est appréciable suite à l'addition de *S. vermiculata* principalement à teneurs salines inhibitrices (Tab. 20).

Tab. 20 : Facteurs d'amélioration de la croissance de *Streptomyces* sp. SF5 et de *Streptomyces* sp. MADO2 cultivés en milieux M63 et ISP5 par *S. vermiculata* en présence de NaCl.

Facteurs d'amélioration de la croissance bactérienne				
	<i>Streptomyces</i> sp. SF5		<i>Streptomyces</i> sp. MADO2	
NaCl (M)	M63	ISP5	M63	ISP5
0	x15	x2.6	x4.64.10 ²	x1.3.10 ³
0.1	x47	x14	x4.10 ²	x2.10 ³
0.5	x3.07.10 ²	x41.81	x5.4.10 ³	x1.0810 ³
0.8	x6.47.10 ²	x1.36.10 ²	x1.3.10 ²	x1.6.10 ⁴
1	x3.6.10 ³	x2.4.10 ²	x1.95.10 ²	x4.2.10 ⁴

L'action de *S. vermiculata* est notoire chez les deux bactéries. Néanmoins, l'effet diffère selon la bactérie et le milieu de culture. *Streptomyces* sp. MADO2 répond favorablement à l'halophyte par comparaison à *Streptomyces* sp. SF5, les facteurs d'amélioration de la croissance bactérienne sont significatifs en ISP5. Ceci laisse à penser qu'il existe un phénomène d'adaptation aux constituants et aux éléments nutritifs que contiendrait l'halophyte. Rappelons que *Nocardiopsis* sp. a été prélevée à partir d'éponges marines (côtes de l'Inde). La bactérie aurait trouvé un milieu relativement identique à son site de prélèvement. Les halophytes constituent une source de matière minérale et organique, chez *Kochia sieversiana*, par exemple, de nombreuses solutés (Na⁺, K⁺, SO₄⁻², Ca⁺², Mg⁺², Cl⁻, NO₃⁻, H₂PO₃⁻, glycine bétaine, proline, sucres solubles et acides organiques) y ont été déterminés (Yang *et al.*, 2007). D'autres halophytes : *Suaeda* sp., *Acacia* sp. *Salicornia* sp.,

Pandanus tectorius, *Glycyrrhiza uralensis*, *Asparagus persicus* contiennent de l'amidon, des sucres et des protéines. *Salsola imbricata* et *S. soda* renferment des ions : Na^+ , K^+ , Ca^{+2} , Fe^{+2} , Cu^{+2} et Zn^{+2} (Zhao *et al.*, 2011). Chez *Streptomyces* sp. SF5, l'action de *S. vermiculata* est plus marquée sur M63 et le degré de potentialité osmoprotectrice est proportionnel à la concentration saline. L'effet de *S. vermiculata* est prépondérant en M63. Ceci serait dû à l'existence d'une interférence entre certains composés de l'halophyte avec d'autres du milieu de culture (ISP5) minimisant ainsi l'action de *S. vermiculata* ou d'un phénomène de compétition entre des éléments de l'halophyte avec d'autres de la bactérie diminuant par conséquent le développement de *Streptomyces* sp. D'autre part, les mêmes constatations concernant la cinétique de croissance de *Streptomyces* sp. SF5 en présence de *S. vermiculata* sont à noter, l'action est notoire en M63, l'efficacité osmoprotectrice de l'halophyte dépasse celle de la GB, de la proline et de tréhalose (Tab. 21).

Tab. 21 : Facteurs d'amélioration de la croissance de *Streptomyces* sp. SF5 en M63 en présence de *S. vermiculata*, de GB, de proline et de tréhalose.

Facteurs d'amélioration de la croissance bactérienne en				
M63				
NaCl (M)	<i>S.vermiculata</i>	GB	Proline	Tréhalose
0	x3.44	x2.99	x1.3	x1.21
0.1	x3.16	x1.22	x1.18	x1.18
0.5	x 2.49	x 1.11	x1.14	x1.11
0.8	x5.87	x2.85	x2.63	x1.39
1	x11.87	x3.43	x3.06	x1.93

S. vermiculata, la GB, la proline et le tréhalose restaurent également la croissance bactérienne en ISP5 (Tab. 22), celle-ci chute à 0.1M/NaCl en présence de ces trois osmoprotecteurs.

Tab. 22 : Facteurs d'amélioration de la croissance de *Streptomyces* sp. SF5 en ISP5 en présence de *S. vermiculata*, de GB, de proline et de tréhalose.

Facteurs d'amélioration de la croissance bactérienne en milieu ISP5 par rapport au témoin				
Concentration en NaCl (M)	<i>S.vermiculata</i>	GB	Proline	Tréhalose
0	x1.19	x1.16	x1.13	x1.13
0.5	x1.72	x1.38	x1.11	x1.05
0.8	x3.68	x1.89	x1.13	x1.11
1	x15.53	x3.28	x1.53	x1.25

Les halophytes, plantes adaptées aux conditions salines, vivent dans des milieux où la concentration de NaCl est supérieure à 200mM, elles constituent environ 1% de la flore végétale (Flowers et Colmer, 2008). Les Chenopodiaceae (*Salsola*, *Atriplex*, *Halosarcia*, *Spinacia*, *Sarcocornia* et *Salicornia*) accumulent la GB (Rhodes et Hanson, 1993) et des ions : Ca^{+2} , K^{+} et Mg^{+2} ; ces éléments jouent un rôle extrêmement important dans l'ajustement osmotique (Yasseen et Abu-Al-Basal, 2010).

Des taux élevés en proline sont accumulés par *Atriplex halimus* et *A. canescens* en réponse au stress osmotique (Ouiza *et al.*, 2010) De plus, la GB et la proline sont les osmoprotecteurs majeurs chez *Allenrolfea occidentalis* (Chenopodiaceae) (Gul et Khan, 2008) et chez *Kochia sieversiana* où la concentration en proline augmente (x13 ; NaCl/320mM) (Yang *et al.*, 2007). Ces deux osmolytes sont retrouvés en teneurs importantes au niveau des chloroplastes et du cytosol des halophytes dans des conditions de stress environnemental (Ben

Hassine *et al.*, 2008). Chez les plantes, la GB est impliquée dans divers processus : la stabilisation des réactions photosynthétiques, la structure des protéines extrinsèques du complexe PSII, la synthèse de l'ATP et l'activation des enzymes (Mäkelä *et al.*, 1996).

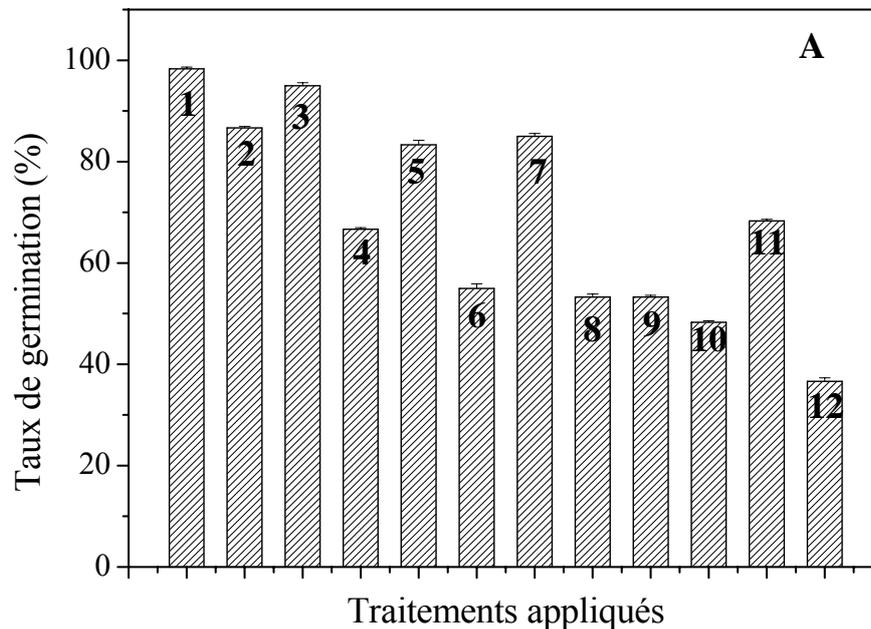
De nombreuses études ont montré l'effet osmoprotecteur de la GB sur la croissance bactérienne dans des milieux salés contenant du NaCl/0.3-1M (Csonka, 1989 ; Csonka et Hanson, 1991). La proline et le tréhalose sont aussi impliqués dans la restauration de la croissance bactérienne. La proline est accumulée à de fortes concentrations chez de nombreux microorganismes procaryotes et eucaryotes face au stress salin (Le Rudulier, 1993).

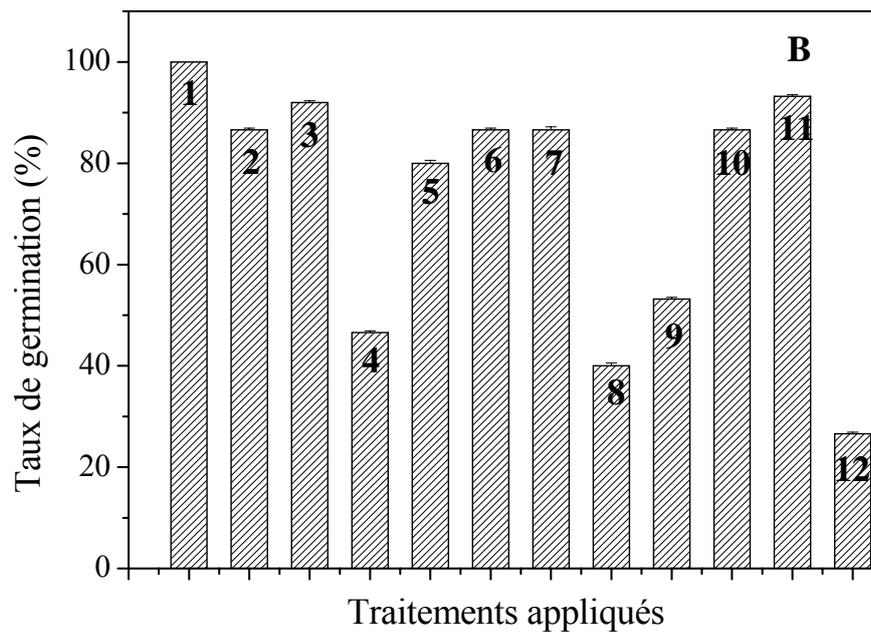
Le tréhalose est retrouvé chez les organismes halotolérants (3% de NaCl). L'addition de 12.5mM au milieu de culture améliore sensiblement le développement de *Streptomyces griseus* en présence de concentrations croissantes de NaCl (Killham et Firestone, 1984b). Il stabilise les membranes, les protéines et les parois durant les périodes de déshydratation et constitue le premier osmolyte accumulé dans certaines conditions de croissance défavorables (da Costa *et al.*, 1998).

VII- Effet du NaCl, de *S. vermiculata*, de *Streptomyces* sp. SF5 et de *S. vermiculata*+ *Streptomyces* sp. SF5 sur la germination et la croissance de *Triticum durum* L.

VII-1. Germination des graines de *T. durum* L. dans l'eau distillée (boîtes) et sur sol

La germination des graines de *Triticum durum* L. est influencée par le traitement appliqué, elle est soit inhibée ou améliorée. Le nombre des graines germées est important sur boîtes et sur sol pour les traitements 1 (témoin, 19.66 ± 0.33 ; 5 ± 0.00) et 3 (témoin+*Streptomyces* sp. SF5, 19 ± 0.57 ; 4.66 ± 0.33). Celui-ci n'est pas considérablement affecté à 100mM/NaCl (16.66 ± 0.88 et 4 ± 0.57). L'inhibition de la germination est notoire à 200mM/NaCl (10.66 ± 0.33 et 2.66 ± 0.13). Toutefois, cet effet est aussi observé suite à l'addition de *S. vermiculata*, seule ou combinée à *Streptomyces* sp. SF5 principalement sur boîtes. *Streptomyces* sp. améliore efficacement le nombre des graines germées (traitements 3, 7 et 11). Les taux de germination sur boîtes et sur sol sont représentés dans la figure 33.





1: Témoin, 2: Témoin+ *S. vermiculata*, 3: Témoin+*Streptomyces* sp.SF5, 4: Témoin+*S.vermiculata*+*Streptomyces* sp. SF5, 5: 100 mM, 6: 100 mM+*S.vermiculata*, 7: 100mM+*Streptomyces*.sp.SF5, 8: 100mM+*S.vermiculata*+ *Streptomyces* sp. SF5, 9: 200mM, 10: 200mM+*S.vermiculata*, 11: 200mM+*Streptomyces*.sp.SF5, 12: 200mM+*S.vermiculata*+ *Streptomyces*

Fig. 33 : Taux de germination de *T. durum*: (A), « sur boîtes de pétri » (B), « sur sol » en fonction des traitements appliqués.

VII-1-1. Cinétique de germination des graines cultivées dans l'eau distillée (boîtes)

L'évolution de la germination des graines de blé de tous les échantillons est suivie toutes les 48 heures pendant 14 jours. La variation et l'influence des traitements sur le nombre des graines germées sont notées à chaque fois. La germination est maximale en absence de NaCl (traitement 1, 98.3%±0.33). A 100 et 200mM/NaCl, le nombre des graines germées diminue principalement à 200 mM (53.3%±0.33), l'effet inhibiteur de *S.vermiculata* seule ou combinée à la souche bactérienne dépasse largement celui du NaCl (Fig. 34).

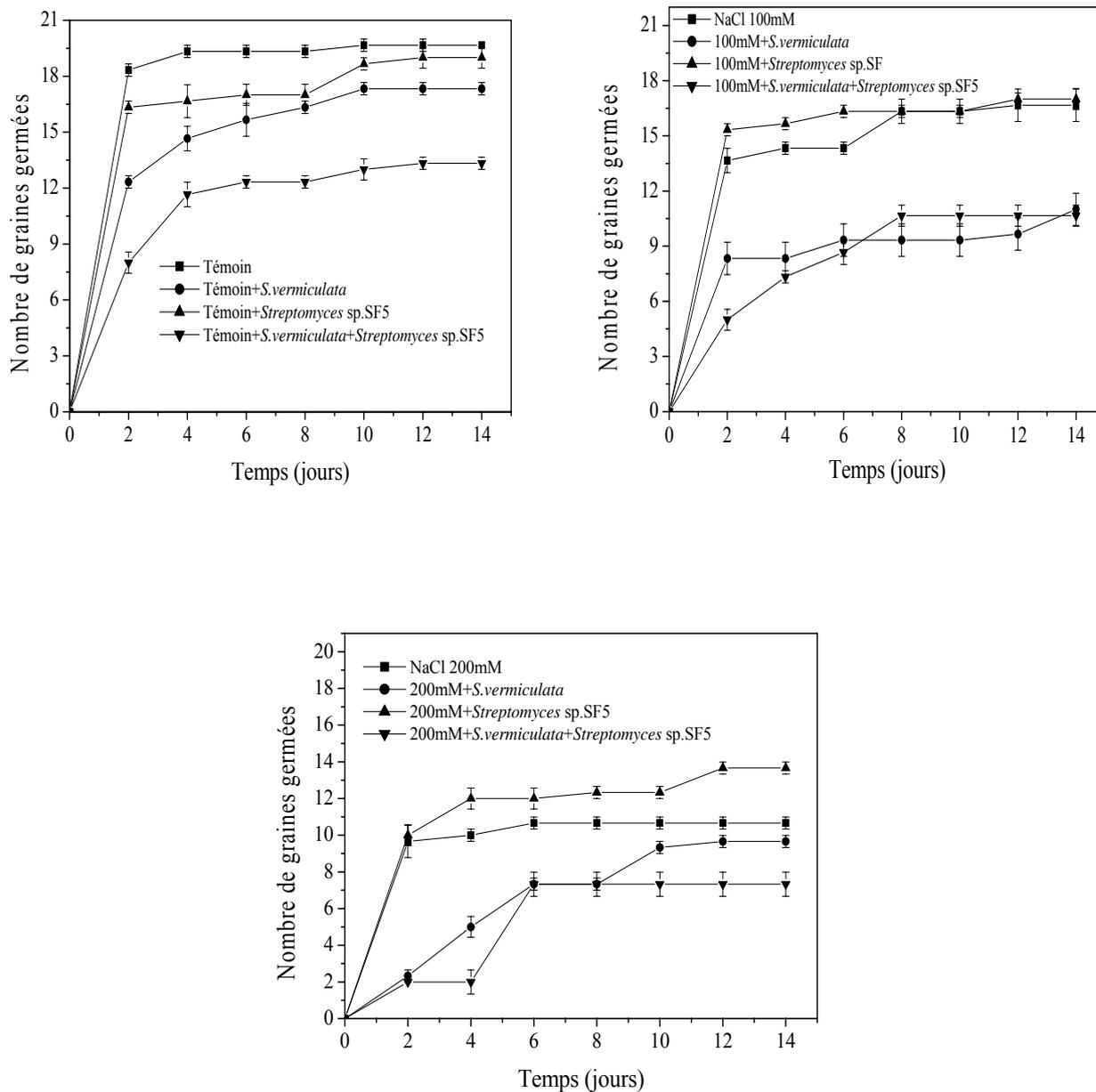


Fig. 34 : Effet du NaCl (0, 100 et 200 mM) de *S.vermiculata*, de *Streptomyces* sp. SF5 et de *S.vermiculata*+ *Streptomyces* sp. SF5 sur le nombre des graines germées de *Triticum durum* L. cultivé en eau distillée (boîtes).

VII-1-2. Cinétique de germination sur sol

L'étude de la germination des graines de *Triticum durum* L. est suivie pendant 30 jours. Un maximum de graines germées est obtenu au 22^{ème} jour pour le traitement 1 (NaCl/0mM ; 5 ± 0.00), ce nombre diminue à 200mM/NaCl (2.66 ± 0.13). La combinaison de *S. vermiculata* et *Streptomyces* sp. SF5 inhibe fortement la germination principalement à 100 mM (2 ± 0.12) et à 200 mM (1.33 ± 0.2) (Fig. 35).

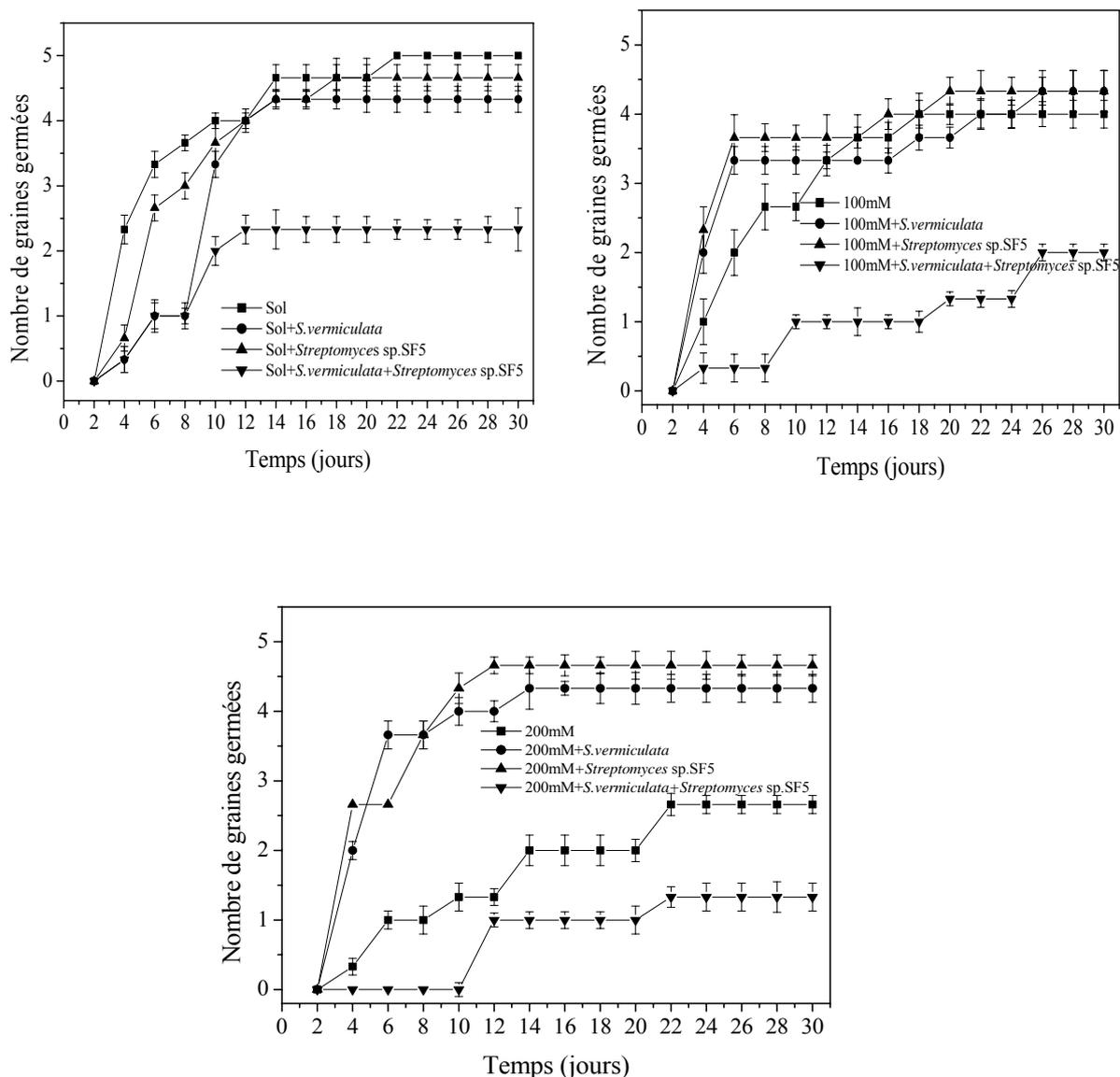
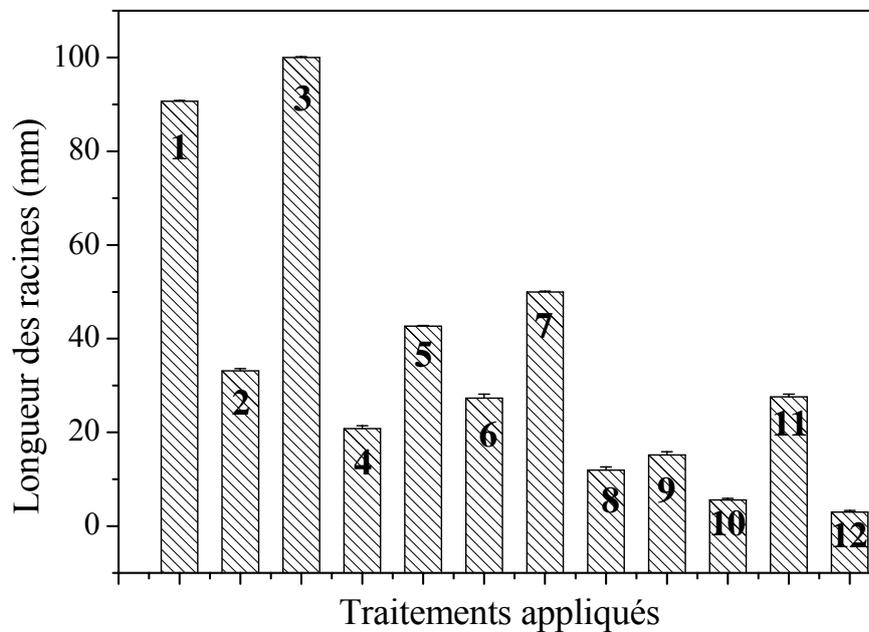


Fig. 35: Effet du NaCl (0, 100 et 200 mM) de *S.vermiculata*, de *Streptomyces* sp. SF5 et de *S.vermiculata*+ *Streptomyces* sp. SF5 sur le nombre des graines germées de *Triticum durum* L. cultivé sur sol.

VII-2. Effet du NaCl, de *S. vermiculata*, de *Streptomyces* sp. SF5 et de *S. vermiculata*+*Streptomyces* sp. SF5 sur la longueur des racines de *Triticum durum* L cultivé en eau distillée (boîtes).

La longueur des racines est maximale pour le traitement 3 (100 ± 0.16 mm) suivi par le traitement 1 (90.66 ± 0.16). Le NaCl (100 et 200 mM) réduit fortement les longueurs des racines qui sont respectivement de 42.66 ± 0.16 et 15.2 ± 0.66 mm. Celles-ci sont améliorées par l'apport de *Streptomyces* sp. SF5 (100mM/ 60 ± 0.16 et 200mM/ 27.6 ± 0.33). *S. vermiculata* seule ou combinée affecte négativement les longueurs des racines, elles atteignent les plus faibles valeurs principalement pour les traitements 4 (20.83 ± 0.6), 8 (11.96 ± 0.66), 10 (5.6 ± 0.33) et 12 (3 ± 0.33) (Fig.36).



1: Témoin,	2: Témoin+ <i>S. vermiculata</i> ,	3: Témoin+ <i>Streptomyces</i> sp.SF5,	4: Témoin+ <i>S.vermiculata</i> + <i>Streptomyces</i> sp. SF5,
5: 100 mM,	6: 100 Mm+ <i>S.vermiculata</i> ,	7: 100mM+ <i>Streptomyces</i> .sp.SF5,	8: 100mM+ <i>S.vermiculata</i> + <i>Streptomyces</i> sp. SF5,
9: 200mM,	10: 200mM+ <i>S.vermiculata</i> ,	11: 200mM+ <i>Streptomyces</i> .sp.SF5,	12: 200mM+ <i>S.vermiculata</i> + <i>Streptomyces</i> sp.SF5.

Fig. 36 : Longueurs des racines de *Triticum durum* cultivé en eau distillée (boîtes) en fonction des traitements appliqués.

VII-2-1. Evolution de la longueur des racines

La longueur des racines augmente régulièrement pour les traitements 1, 3, 5, 7, 9 et 11. Cependant, pour ceux additionnés de *S. vermiculata* seule ou combinée à *Streptomyces* sp., une inhibition remarquable de la longueur des racines est observée, elle est presque constante (Fig.37).

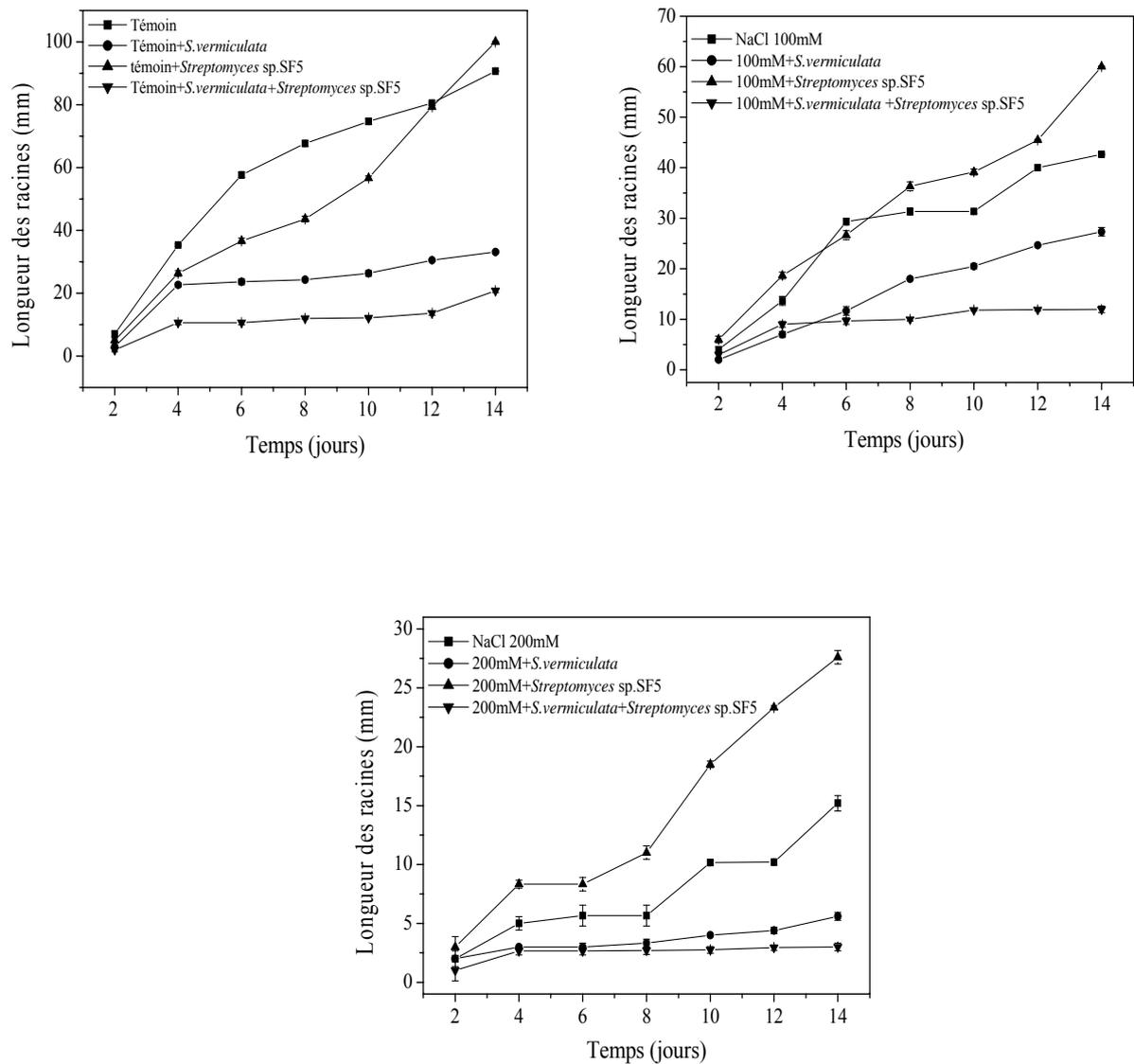


Fig. 37 : Evolution de la longueur des racines de *Triticum durum* L. en présence de NaCl (0,100 et 200 mM), de *S. vermiculata*, de *Streptomyces* sp. SF5 et de *S. vermiculata* +*Streptomyces* sp.SF5.

VII-3. Effet du NaCl, de *S. vermiculata*, de *Streptomyces* sp. SF5 et de *S. vermiculata*+*Streptomyces* sp. SF5 sur la longueur des tiges de *Triticum durum* L. cultivé en eau distillée

La longueur des tiges est maximale pour les traitements 1 (174.5 ± 0.5) et 3 (178.3 ± 0.6 mm). Elle est sensiblement inhibée par le NaCl/100 mM (31.63 ± 0.69) et 200 mM (10.33 ± 0.33). Cet effet est plus prononcé en présence de l'halophyte seule ou combinée et dépasse celui du stress salin : cas des traitements 6 (26.66 ± 0.6), 8 (9.66 ± 0.6), 10 (4.2 ± 0.23) et 12 (3.53 ± 0.16) (Fig. 38).

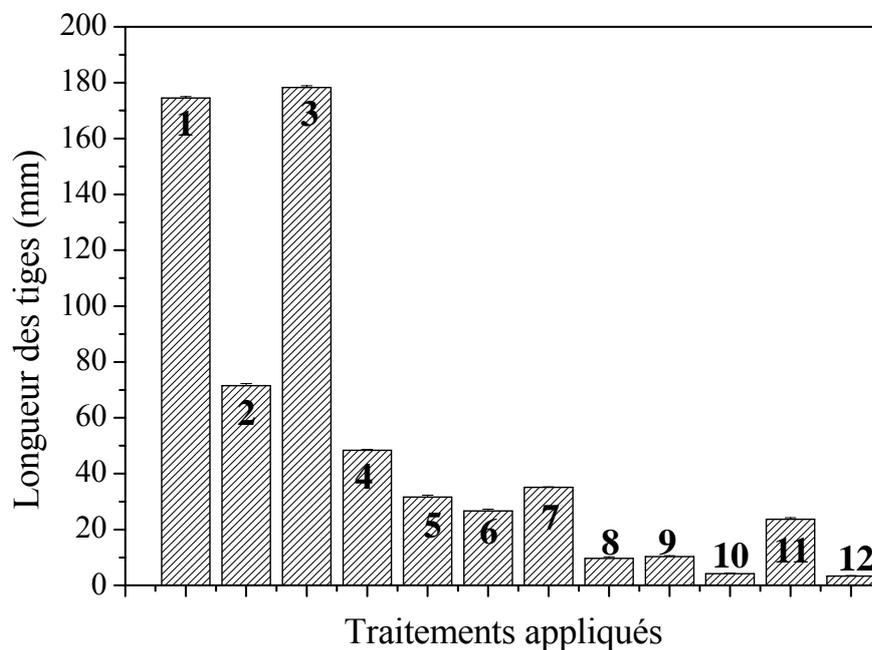


Fig. 38 : Effet du NaCl (0,100 et 200 mM), de *S. vermiculata*, de *Streptomyces* sp. SF5 et de *S. vermiculata* +*Streptomyces* sp.SF5 sur la longueur des tiges de *T. durum* cultivé en eau distillée (boites).

VII-3-1. Evolution de la longueur des tiges

La longueur des tiges est maximale pour les traitements 1 et 3. Elle augmente très faiblement pour les échantillons avec ou sans sel ajoutés de *S. vermiculata*, à ceci s'ajoute l'effet inhibiteur de la combinaison de l'halophyte et *Streptomyces* sp. SF5. L'évolution est exponentielle en présence de NaCl (100 et 200 mM) additionné de *Streptomyces* sp.SF5 (Fig.39).

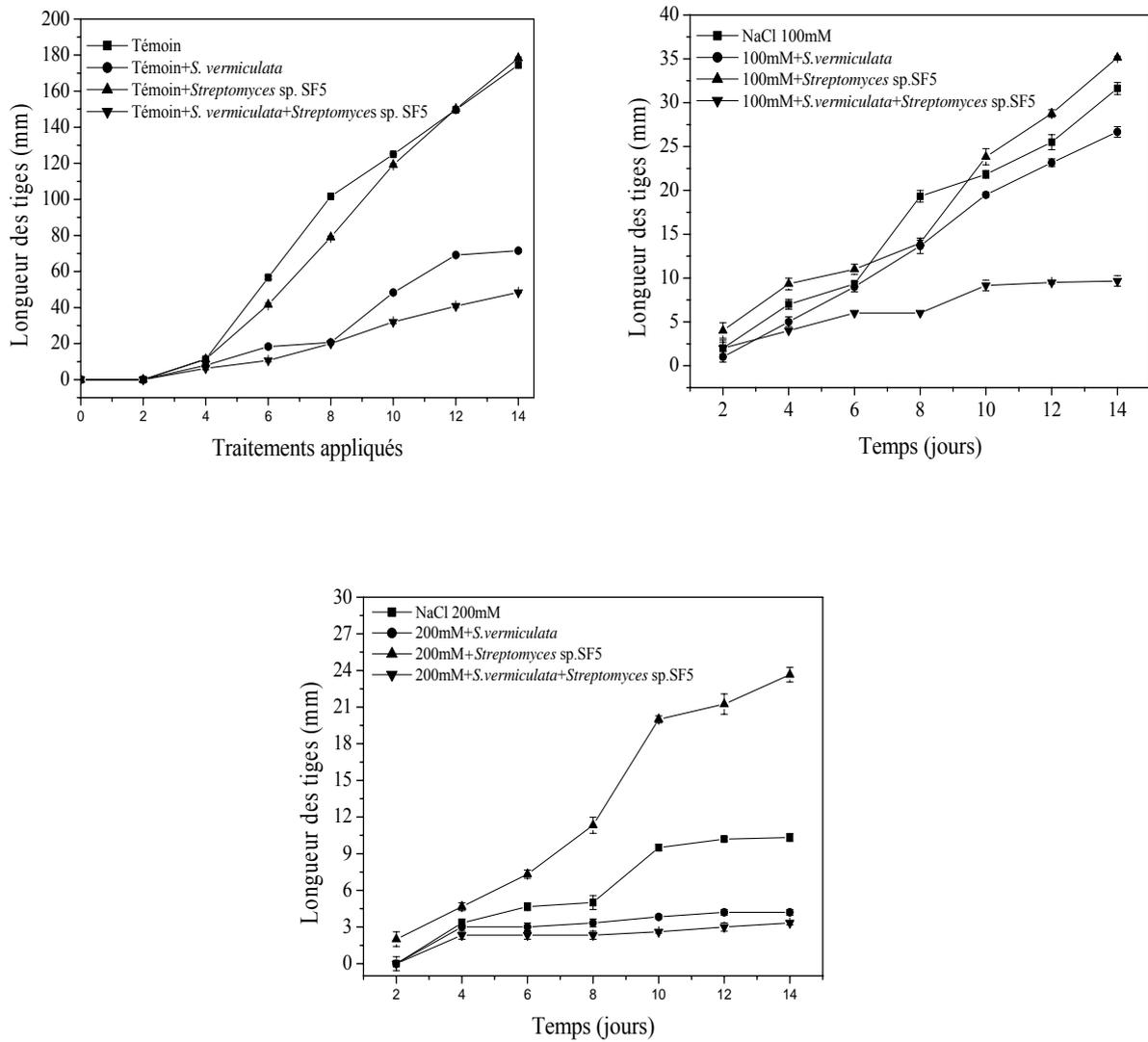
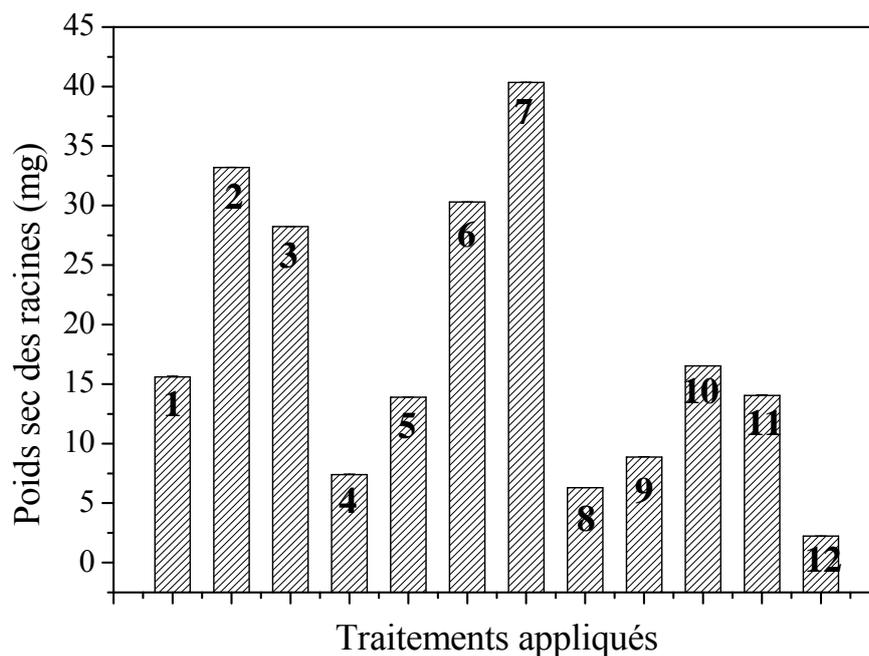
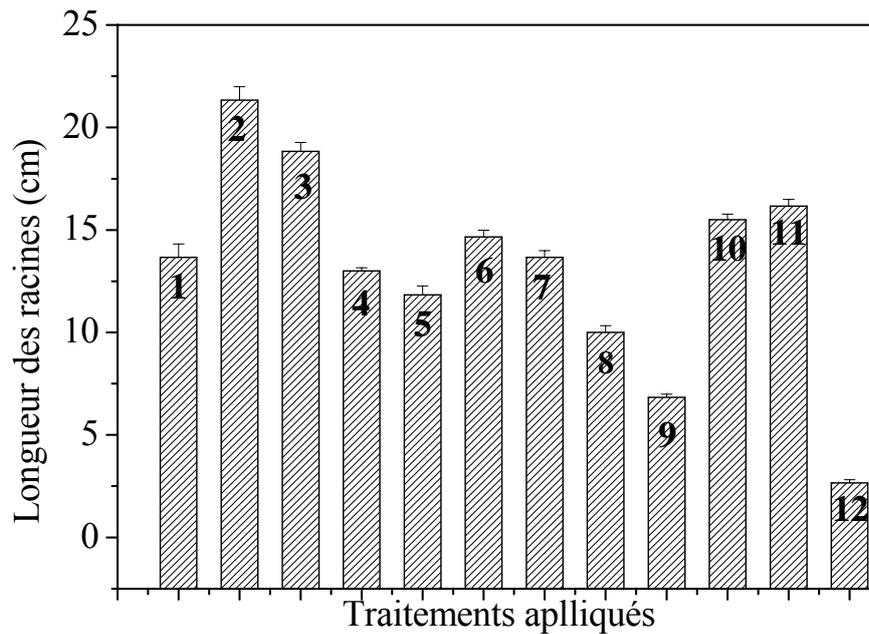


Fig. 39: Evolution de la longueur des tiges de *Triticum durum* L. en présence de NaCl (0,100 et 200 mM), de *S. vermiculata*, de *Streptomyces* sp. SF5 et de *S. vermiculata* +*Streptomyces* sp.SF5.

VII-4. Effet du NaCl, de *S. vermiculata*, de *Streptomyces* sp. SF5 et de *S. vermiculata*+*Streptomyces* sp. SF5 sur le poids sec et la longueur des racines de *T. durum* cultivé sur sol

Le poids sec et la longueur des racines sont sensiblement affectés par le NaCl principalement à 200 mM : une diminution de moitié est constatée (de 15.61 ± 0.072 à 8.87 ± 0.037 mg) et de (13.66 ± 0.66 à 6.83 ± 0.16 cm). L'effet inhibiteur est aussi noté en présence de *S. vermiculata*+*Streptomyces* sp. SF5, les poids sec sont respectivement de 7.4 ± 0.057 à 6.3 ± 0.012 et 2.23 ± 0.018 cm à 100 et 200 mM/NaCl. Les longueurs sont de 13 ± 0.1 à 10 ± 0.33 et 2.66 ± 0.16 cm. *S. vermiculata* stimule favorablement le poids sec des racines par comparaison à *Streptomyces* sp. SF5 (NaCl/0 et 200mM). La longueur des racines est également améliorée pour les traitements 2 (de 13.66 ± 0.66 à 21.33 ± 0.66) et 6 (de 11.83 ± 0.83 à 14.66 ± 0.33 cm). *Streptomyces* est efficace à 100 mM en stimulant le poids sec des racines (de 13.9 ± 0.011 à 40.35 ± 0.023). La longueur des racines est améliorée (x2.36 fois) à 200 mM (Fig. 40).





1: Témoin, 2: Témoin+ *S. vermiculata*, 3: Témoin+*Streptomyces* sp.SF5, 4: Témoin+*S.vermiculata*+*Streptomyces* sp. SF5, 5: 100 mM, 6: 100 Mm+*S.vermiculata*, 7: 100mM+*Streptomyces*.sp.SF5, 8: 100mM+*S.vermiculata*+ *Streptomyces* sp. SF5, 9: 200mM, 10: 200mM+*S.vermiculata*, 11: 200mM+*Streptomyces*.sp.SF5, 12: 200mM+*S.vermiculata*+ *Streptomyces*

Fig. 40 : Effet du NaCl (0,100 et 200 mM), de *S. vermiculata*, de *Streptomyces* sp. SF5 et de *S. vermiculata*+ *Streptomyces* sp. SF5 sur le poids sec et la longueur des racines chez *T. durum* cultivé sur sol.

VII-5. Effet du NaCl, de *S. vermiculata*, de *Streptomyces* sp. SF5 et de *S. vermiculata*+*Streptomyces* sp. SF5 sur le poids sec et la longueur des tiges

Le poids sec des tiges est considérablement diminué par rapport à celui des racines. Il est réduit par presque 3 fois à 200 mM par comparaison au témoin (de 21.54 ± 0.037 à 8.03 ± 0.086). La longueur des tiges est également réduite (x2.08 fois) (de 40.33 ± 0.33 à 19.33 ± 0.33). L'effet stimulateur de *S. vermiculata* est similaire à celui de *Streptomyces* sp. SF5 principalement à 0 et 100 mM/NaCl. L'action osmoprotectrice de l'halophyte sur ces deux paramètres est importante à 200 mM par rapport à *Streptomyces* sp. SF5 (de 8.03 ± 0.086 à 27.89 ± 0.049 mg/g) et (de 19.33 ± 0.33 à 38.83 ± 0.16 cm). Combinée à la souche bactérienne, elle inhibe fortement le poids et la longueur des tiges (traitements 4, 8 et 12) (Fig. 41).

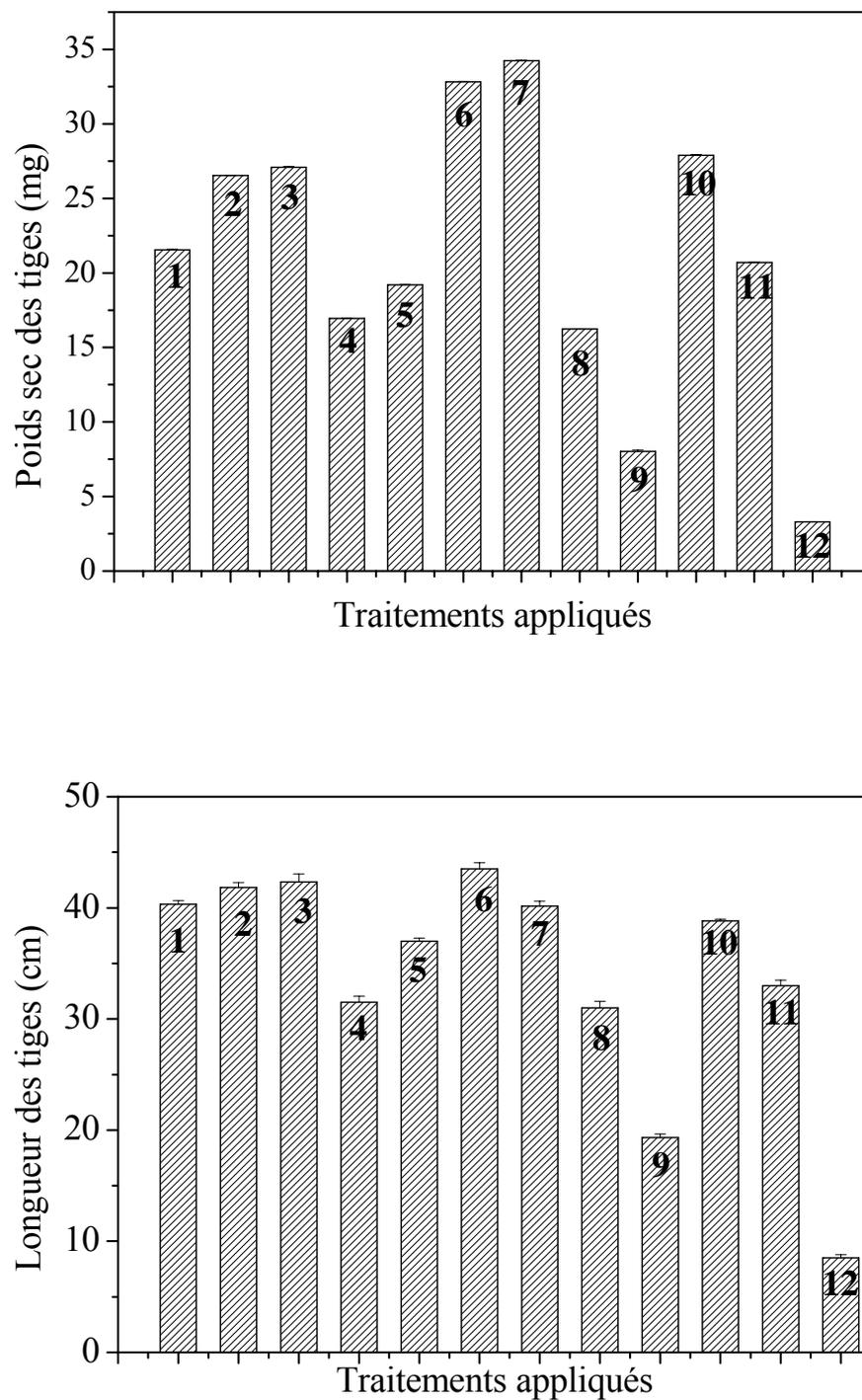


Fig. 41 : Effet du NaCl (0,100 et 200mM), de *S. vermiculata*, de *Streptomyces* sp. SF5 et de *S. vermiculata*+ *Streptomyces* sp. SF5 sur le poids sec et la longueur des tiges chez *T. durum* cultivé sur sol.

**VII-6 Effet du NaCl, de *S. vermiculata*, de *Streptomyces* sp. SF5 et de *S. vermiculata*+
Streptomyces sp. SF5 sur l'accumulation de la proline**

La teneur en proline est identique pour les traitements (1, 2, 3 et 4) et élevée pour le n=°5 (100mM/NaCl) ($45.3 \pm 0.1 \mu\text{g/g}$ de matière fraîche). A 200 mM de NaCl, elle atteint une teneur supérieure à celle du témoin (20.31 ± 0.1). Les teneurs de cet osmolyte chutent en présence de *S. vermiculata*, de *Streptomyces* sp. SF5 seules ou combinées (Fig. 42).

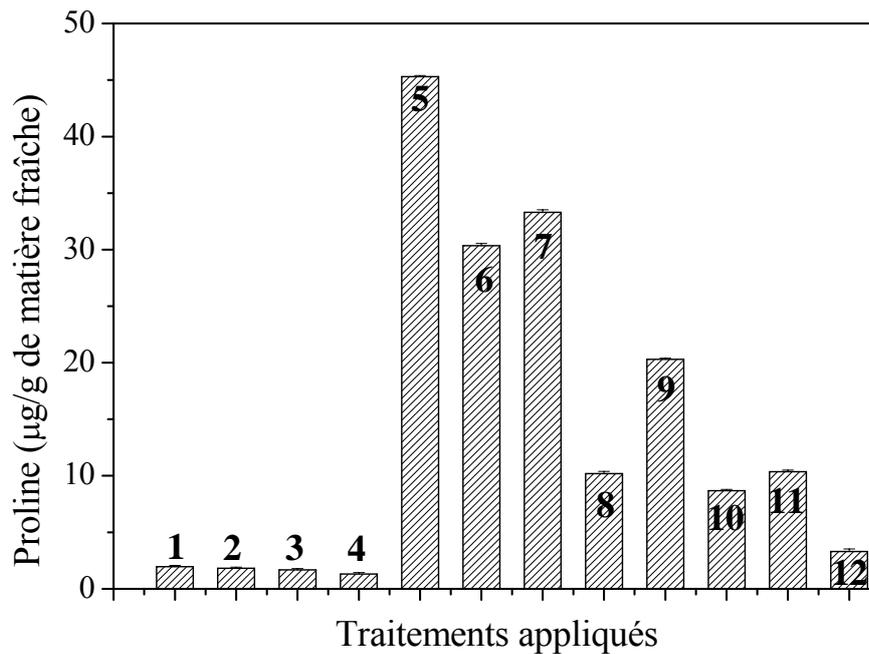


Fig. 42: Effet du NaCl (0,100 et 200mM), de *S. vermiculata*, de *Streptomyces* sp. SF5 et de *S. vermiculata*+ *Streptomyces* sp. SF5 sur la teneur en proline chez *T. durum*.

**VII-7. Effet du NaCl, de *S. vermiculata*, de *Streptomyces* sp. SF5 et de *S. vermiculata*+
Streptomyces sp. SF5 sur les teneurs en chlorophylle a**

Le traitement 3 fournit une teneur maximale en chlorophylle a ($1.78 \pm 0.01 \text{ mg/g}$). Pour les traitements 1 et 2 les concentrations sont presque identiques (1.74 ± 0.01 et 1.75 ± 0.02). Le NaCl 100 et 200 mM réduit ces teneurs : (1.35 ± 0.01 et 0.51 ± 0.02). *S. vermiculata* et *Streptomyces* sp. SF5 les améliorent considérablement. En absence et présence de NaCl, *S. vermiculata* +*Streptomyces* sp. SF5 font chuter les teneurs en chlorophylle a (1.04 ± 0.02 , 0.95 ± 0.01 et 0.46 ± 0.02) (Fig. 43).

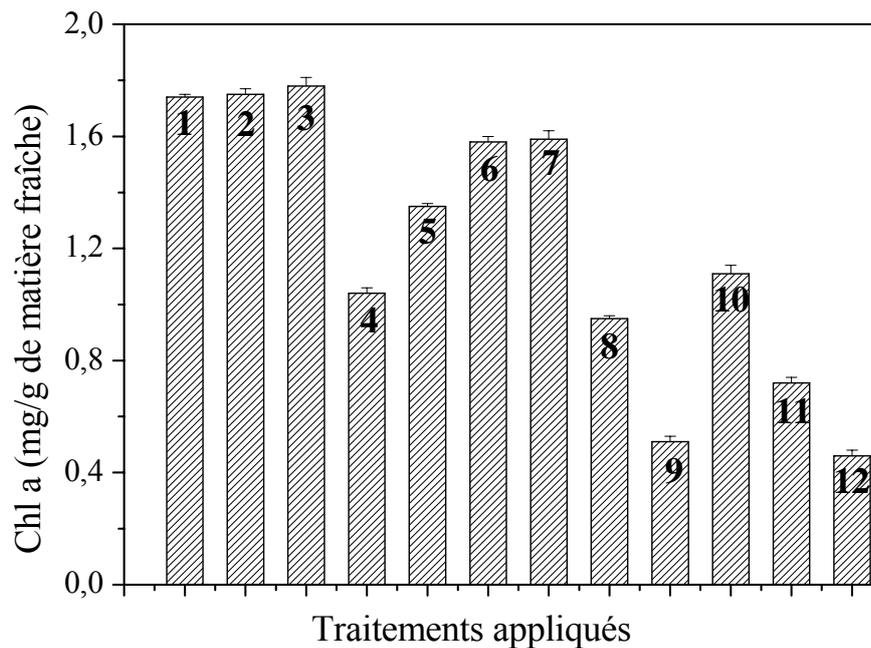


Fig. 43 : Effet du NaCl (0,100 et 200 mM), de *S. vermiculata*, de *Streptomyces* sp. SF5 et de *S. vermiculata*+ *Streptomyces* sp. SF5 sur la teneur en chlorophylle a chez *T. durum*.

VII-8. Effet du NaCl, de *S. vermiculata*, de *Streptomyces* sp. SF5 et de *S. vermiculata*+ *Streptomyces* sp. SF5 sur les teneurs en chlorophylle b

Des teneurs maximales et identiques en chlorophylle b sont observées pour les traitements 1, 2 et 3 (0.98 ± 0.01 , 0.99 ± 0.018 et 1 ± 0.01 mg/g). Elles sont réduites significativement en présence de NaCl/200mM (de 0.98 ± 0.01 à 0.38 ± 0.015) et améliorées en présence de *S. vermiculata* et *Streptomyces* sp. SF5 (0.95 ± 0.015 et 0.46 ± 0.03). L'halophyte combinée à *Streptomyces* sp font réduire fortement les concentrations en chlorophylle b (Fig. 44).

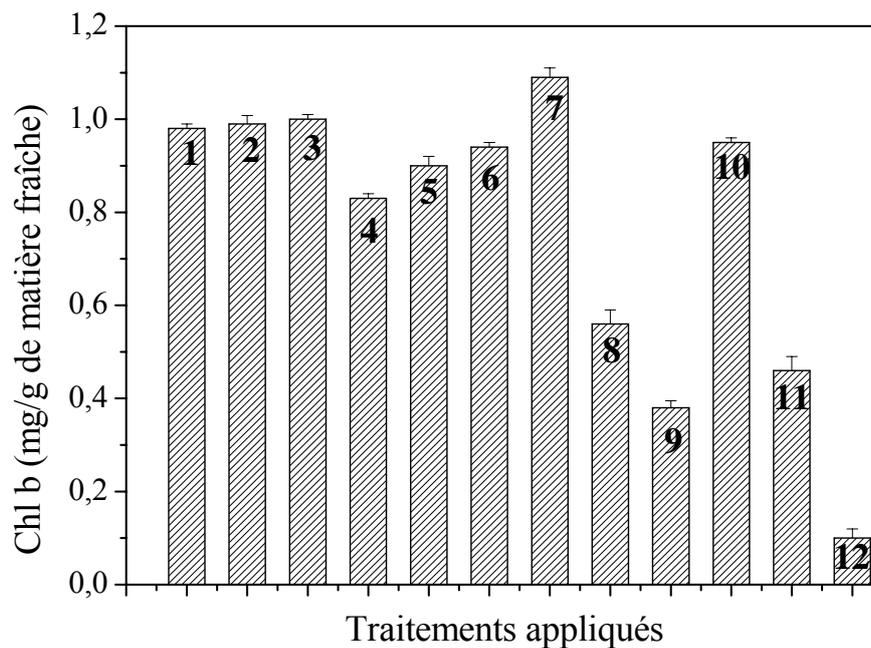


Fig. 44 : Effet du NaCl (0,100 et 200 mM), de *S. vermiculata*, de *Streptomyces* sp. SF5, et de *S. vermiculata*+ *Streptomyces* sp. SF5 sur la teneur en chlorophylle b chez *T. durum*.

VII-9- Effet du NaCl, de *S. vermiculata*, de *Streptomyces* sp. SF5 et de *S. vermiculata*+ *Streptomyces* sp. SF5 sur les teneurs en chlorophylle totale

Une teneur maximale en chlorophylle totale ($2.78 \pm 0.03 \text{ mg/g}$) est observée pour le traitement 3. Des valeurs de 2.72 ± 0.01 et 2.74 ± 0.02 sont obtenues pour les n° 1 et 2. La teneur chute par plus de trois fois à 200mM/NaCl (de 2.72 ± 0.01 à 0.89 ± 0.018). *S. vermiculata* et *Streptomyces* sp. SF5 améliorent les teneurs en chlorophylle totale (2.06 et 1.18). L'halophyte combinée à *Streptomyces* sp. SF5 inhibe fortement la formation de chlorophylle totale à 0, 100 et 200 mM/NaCl, les teneurs sont respectivement de 1.87 ± 0.01 , 1.51 ± 0.02 et 0.56 ± 0.03 (Fig. 45).

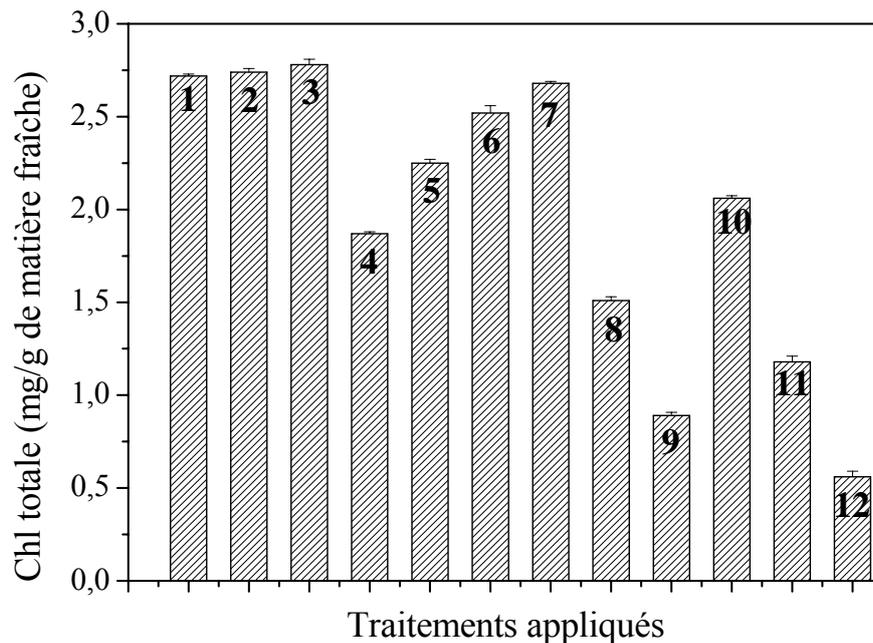


Fig. 45 : Effet du NaCl (0,100 et 200mM), de *S. vermiculata*, de *Streptomyces* sp. SF5 et de *S. vermiculata*+ *Streptomyces* sp. SF5 sur la teneur en chlorophylle totale chez *T. durum*.

VII-10- Effet du NaCl, de *S. vermiculata*, de *Streptomyces* sp. SF5 et de *S. vermiculata*+ *Streptomyces* sp. SF5 sur les teneurs en caroténoïdes

La teneur maximale en caroténoïdes est atteinte pour le traitement 3 (1.35 ± 0.018 mg/g). Les n° 2 et 1 présentent des concentrations respectives à 1.28 ± 0.015 et 1.23 ± 0.02 . Le NaCl (100 et 200 mM) atténue la synthèse des caroténoïdes, les teneurs sont alors 1.13 ± 0.04 et 1.06 ± 0.01 . L'halophyte et *Streptomyces* sp. SF5 restaurent efficacement la synthèse tandis que leur combinaison les réduit sensiblement (Fig. 46).

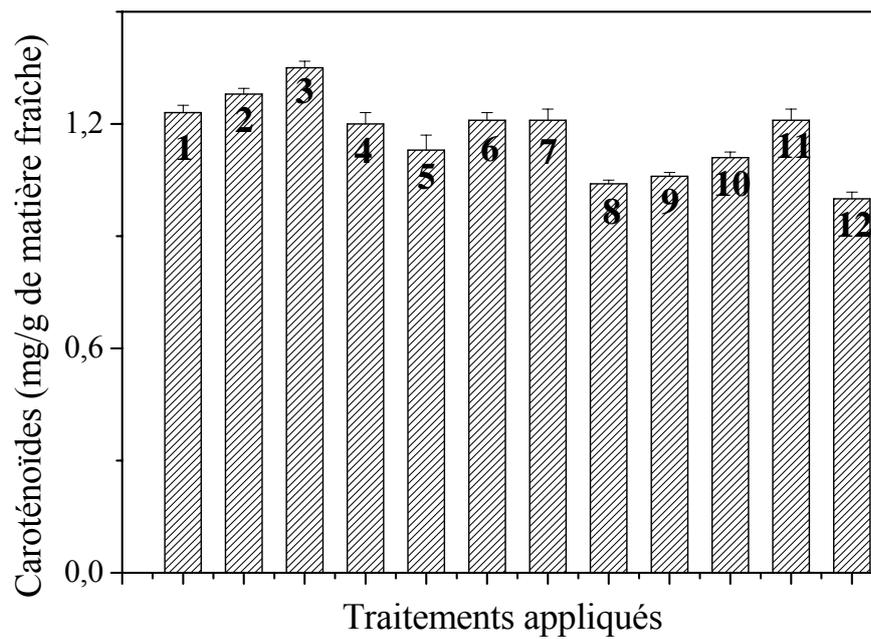


Fig. 46 : Effet du NaCl (0,100 et 200mM), de *S. vermiculata*, de *Streptomyces* sp. SF5 et de *S. vermiculata*+ *Streptomyces* sp. SF5 sur la teneur en caroténoïdes chez *T. durum*.

L'analyse des composantes principales (ACP) a mis en évidence la corrélation entre les différents paramètres de la croissance de *T. durum* L. sur sol pour les douze traitements et les trois expérimentations (0, 100 et 200 mM/NaCl) (Fig.47, 48 et 49).

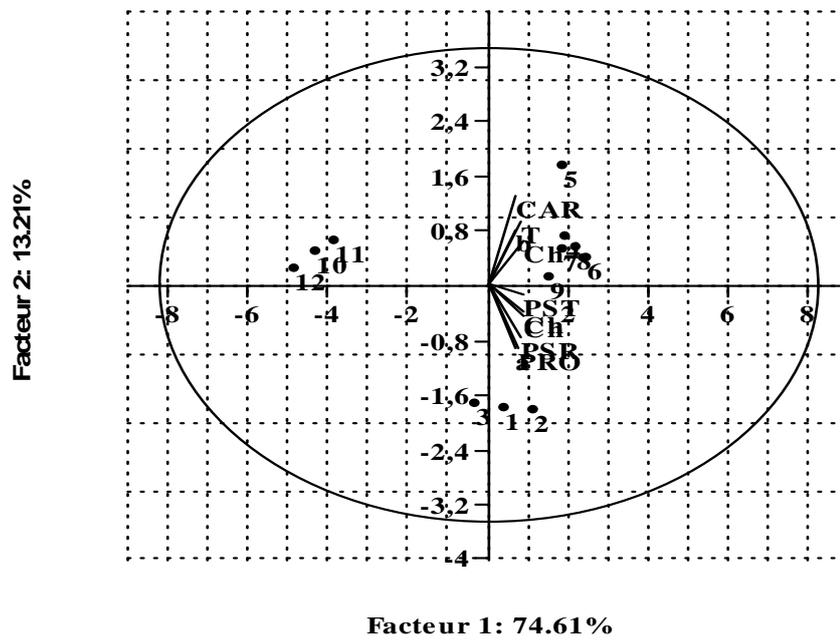


Fig. 47: Cercle de corrélation de l'ACP des différents traitements (sans sel).

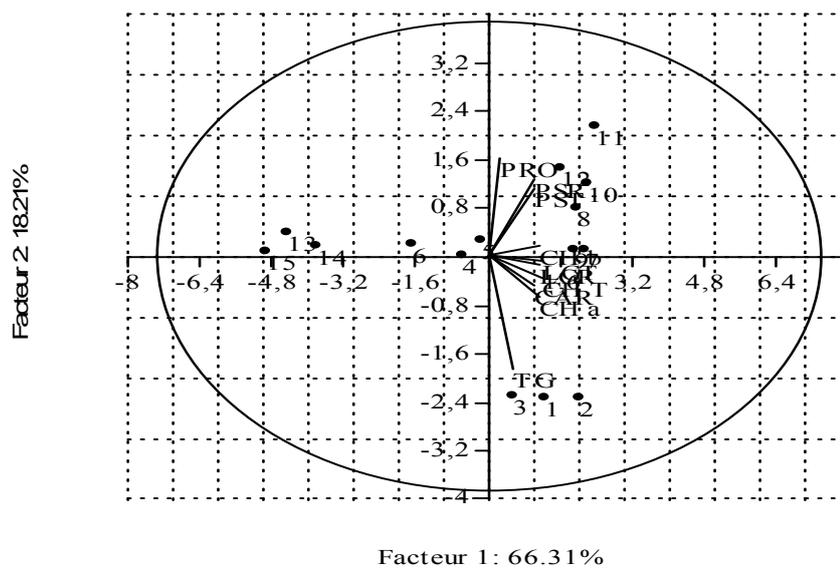


Fig. 48 : Cercle de corrélation de l'ACP des différents traitements (NaCl/100mM).

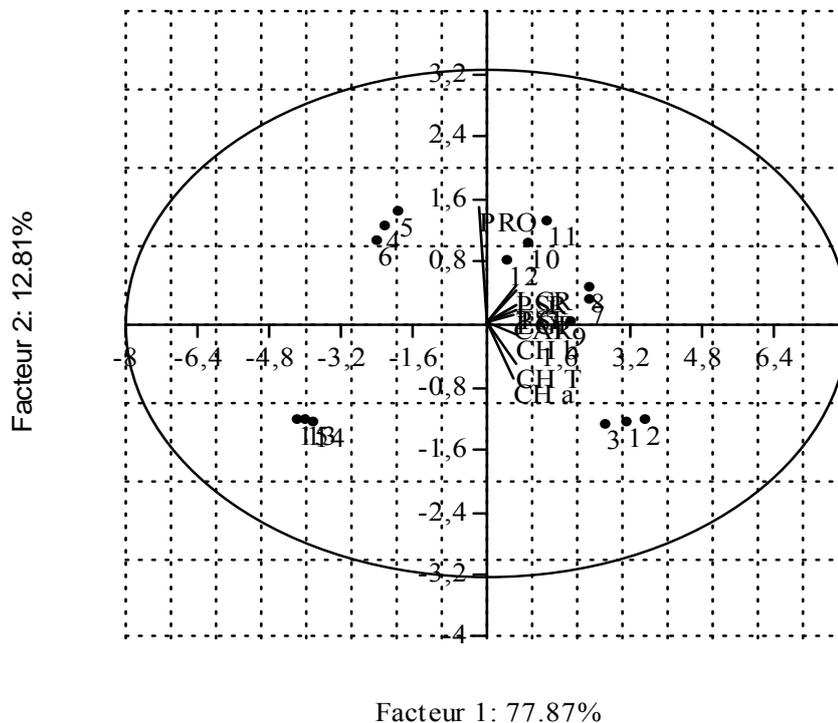


Fig. 49: Cercle de corrélation de l'ACP des différents traitements (NaCl 200mM).

VII-11. Discussion

Le stress salin limite et freine la croissance végétale à travers ses différents paramètres : germination, longueur des racines et des tiges et poids frais et sec des plantes, par la réduction de l'activité hydrique la toxicité ionique spécifique (sodium et chlore) et la diminution de la disponibilité en nutriments essentiels (Carpici *et al.*, 2010). Chaque traitement appliqué exerce un effet hétérogène sur la germination des graines de *Triticum durum* L. Les taux de germination sont calculés pour mieux analyser et comparer ces effets et l'influence de ces traitements sur ce paramètre. L'une des méthodes les plus largement utilisées lors de l'étude de la tolérance des plantes au sel est la détermination du pourcentage de germination (Dantas *et al.*, 2005). En absence de stress salin, la germination est rapide dans l'eau distillée (2 jours) que sur sol (4 jours). Le nombre de graines germées est important pour les traitements 1 et 3 (eau distillée/ 19.66 et 19.00) et 1, 2 et 3 (sol/5.00, 4.3 et 4.66). Les taux de germination sont de 98.3% (eau distillée) et 100%

(sol). De nombreuses études portant sur la germination des conditions de stress salin indiquent que les graines de la plupart des espèces végétales atteignent un niveau maximal de germination dans l'eau distillée (Ghoulam et Fares, 2001; Alatar, 2011). D'un autre côté, le sol constitue un milieu favorable pour la germination et la croissance des plantes. Les débris végétaux morts, les polysaccharides microbiens et les cadavres d'animaux constituent la matière organique du sol. Celui-ci contient entre autres des composés minéraux tels que l'azote, le phosphore, le potassium, le calcium, le magnésium et le soufre. Ces éléments sont considérés comme constitutifs de la chlorophylle et sont donc impliqués dans le processus de la photosynthèse. Leur rôle dans l'amélioration de la croissance racinaire et la germination des graines est à considérer (Davet, 1996).

En présence de 100 mM/NaCl, une réduction non significative des taux de germination est observée (83.3% : eau distillée et 80.00% : sol) respectivement au 12^{ème} et 18^{ème} jour. La salinité retarde la germination pour de nombreuses espèces végétales mais ne réduit pas de façon appréciable le taux de germination (Ayers et Westcot, 1985 ; Baatour *et al.*, 2004). De plus, le blé est considéré comme moyennement tolérant au sel (Hamza, 1967) contrairement à l'orge (Maas, 1986) et au triticale (Touraine et Ammar, 1985). D'un autre côté, certains composés comme l'oxyde nitrique (NO), les diamines et les polyamines oxydases jouent un rôle important dans la germination, le développement racinaire, la floraison et la tolérance aux conditions de stress abiotiques et biotiques (Wimalasekera *et al.*, 2011). A ceci s'ajoute l'effet osmoprotecteur de la proline accumulée dans des conditions de stress salin en protégeant les enzymes et les macromolécules vis-à-vis les effets délétères du NaCl (Mateo *et al.*, 2004).

En présence de 200 mM/NaCl, l'action inhibitrice du NaCl est plus accentuée. Des maxima des taux de germination sont atteints (eau distillée : 53.3% au 6^{ème} jour) (Fig. 50) et (sol : 53.2% au 22^{ème} jour). La diminution des taux de graines germées soumises à un stress salin est liée à un processus de dormance osmotique développé dans ces conditions. De plus, le sel retarde la germination, ce retard serait dû à l'altération des hormones et des enzymes de la graine (Botia *et al.*, 1998). L'enzyme la plus impliquée dans le processus de germination des plantes est l' α -amylase, elle est inhibée par le stress salin en altérant sa structure (Saboury et Karbassi, 2000). Chez *Abelmoschus esculents* L., par exemple, le pourcentage final de germination est réduit par 20% en présence de fortes concentrations salines (Ben Dkhil et Denden, 2010). La diminution de germination serait liée à la salinité en induisant un déséquilibre des processus métaboliques aboutissant à la formation

des composés phénoliques (Ayaz *et al.*, 2000). Dans des conditions salines, la compétition et l'interaction entre ions provoque le déséquilibre nutritionnel. Les ions Na^+ réduisent la disponibilité en ions Ca^{+2} et K^+ ainsi que leur transport aux différentes parties de la plante, ce qui affecte la structure et la composition des organes végétatifs et reproductifs (Cerdà et Martínez, 1988). La présence du NaCl autour des racines entraîne la dégradation de certaines protéines spécifiques impliquées dans la germination et la croissance des racines et des tiges (Khan et Gulzar, 2003).

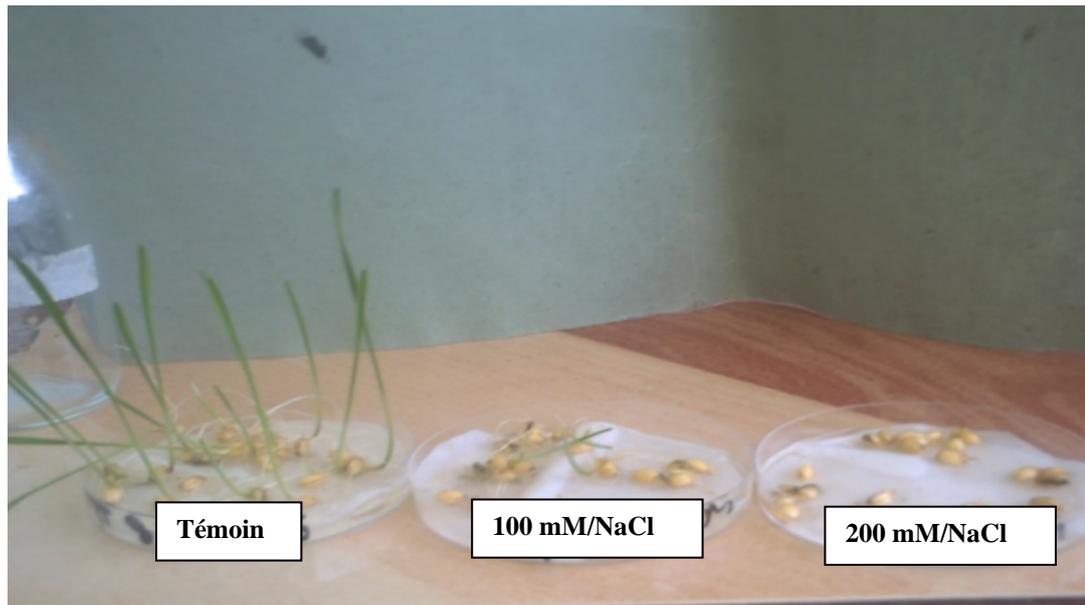


Fig. 50 : Croissance de *Triticum durum* L. en présence de NaCl.

Les taux de germination des graines cultivées dans l'eau distillée diminuent en présence d'extrait d'halophyte (Fig. 51), ils sont de 86.65%, 55% et 48.3% respectivement à 0, 100 et 200 mM/NaCl contrairement aux traitements 1 (98.3%), 5 (83.3%) et 9 (53.3%). Certaines halophytes synthétisent des alcaloïdes cytotoxiques (Wu *et al.*, 1997) et des composés phénoliques connus pour leur pouvoir à précipiter les protéines (Zhu *et al.*, 1997). Ceux-ci affectent le métabolisme énergétique des plantes dont la respiration et la phosphorylation oxydative (Demos *et al.*, 1975). Les acides phénoliques monomériques sont toxiques pour les plantes et certains microorganismes à des concentrations supérieures à 10^{-4} - 10^{-5} M (Whitehead *et al.*, 1982). Ils diminuent sensiblement la germination de nombreuses espèces végétales (Sharma *et al.*, 1986). Les acides tannique, gentsique et *p*-coumarique, par exemple, inhibent la croissance de la coléoptile de *Phaseolus aureus* L. (Demos *et al.*, 1975).

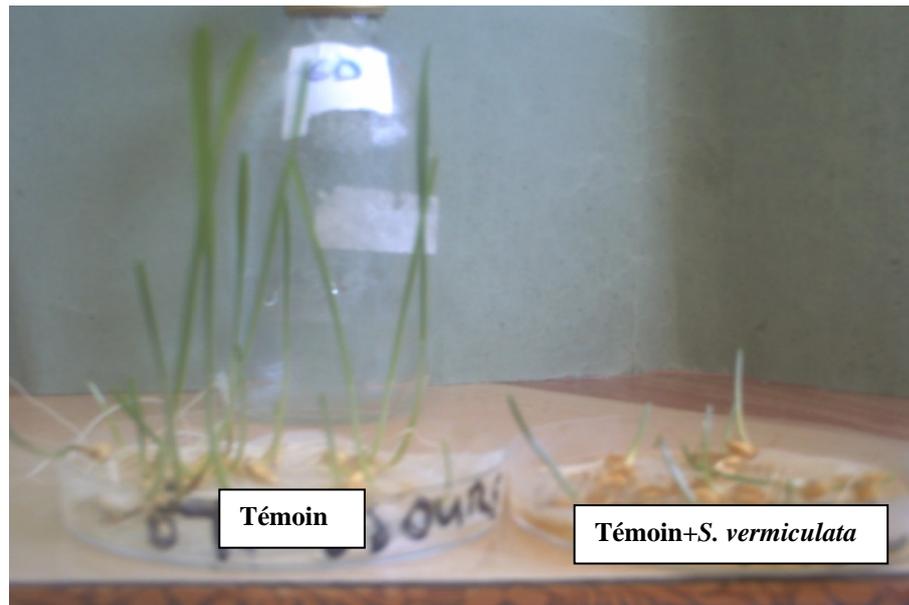


Fig. 51 : Croissance de *Triticum durum* L. en absence et présence de *S. vermiculata*

Cependant, *S. vermiculata* a restauré efficacement la germination sur sol à 100 et 200 mM/NaCl (Fig. 52). Les taux sont de 86.6% et 86.6% contrairement aux traitements 5 (80%) et 9 (53.2%). Cette halophyte a amélioré la germination par des facteurs respectifs de 1.62 et 1.08 fois à 200 et 100mM/NaCl. *S. vermiculata* est connue par son pouvoir d'accumuler des composés Dragendorff-positifs (glycine bétaine). Ce composé-onium est universellement rencontré chez les Chenopodiaceae où il demeure un caractère d'halotolérance consistant (Grieve et Maas, 1984).

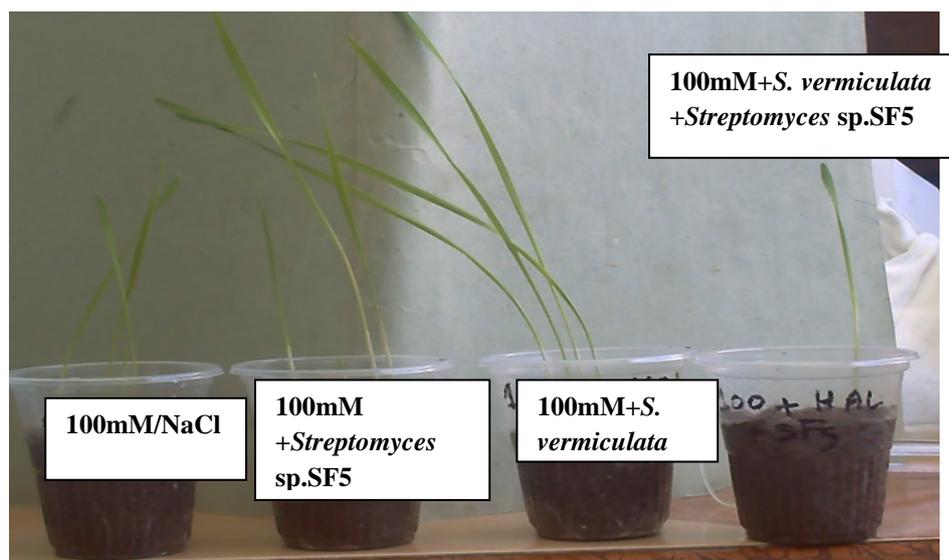


Fig. 52 : Croissance de *Triticum durum* L. en présence NaCl/100mM, de *Streptomyces* sp. SF5+100mM et *S. vermiculata*+100mM.

La combinaison entre *S. vermiculata* et *Streptomyces* sp. SF5 affecte considérablement la germination par comparaison aux autres traitements. Toutefois, l'effet est plus prononcé en présence de NaCl. Les taux de germination en absence et en présence de NaCl (100 et 200 mM) sont respectivement de 66.65%, 53.3% et 36.63% par rapport aux traitements 1 (98.3%), 5 (83.3%) et 9 (53.3%) (Fig. 53).

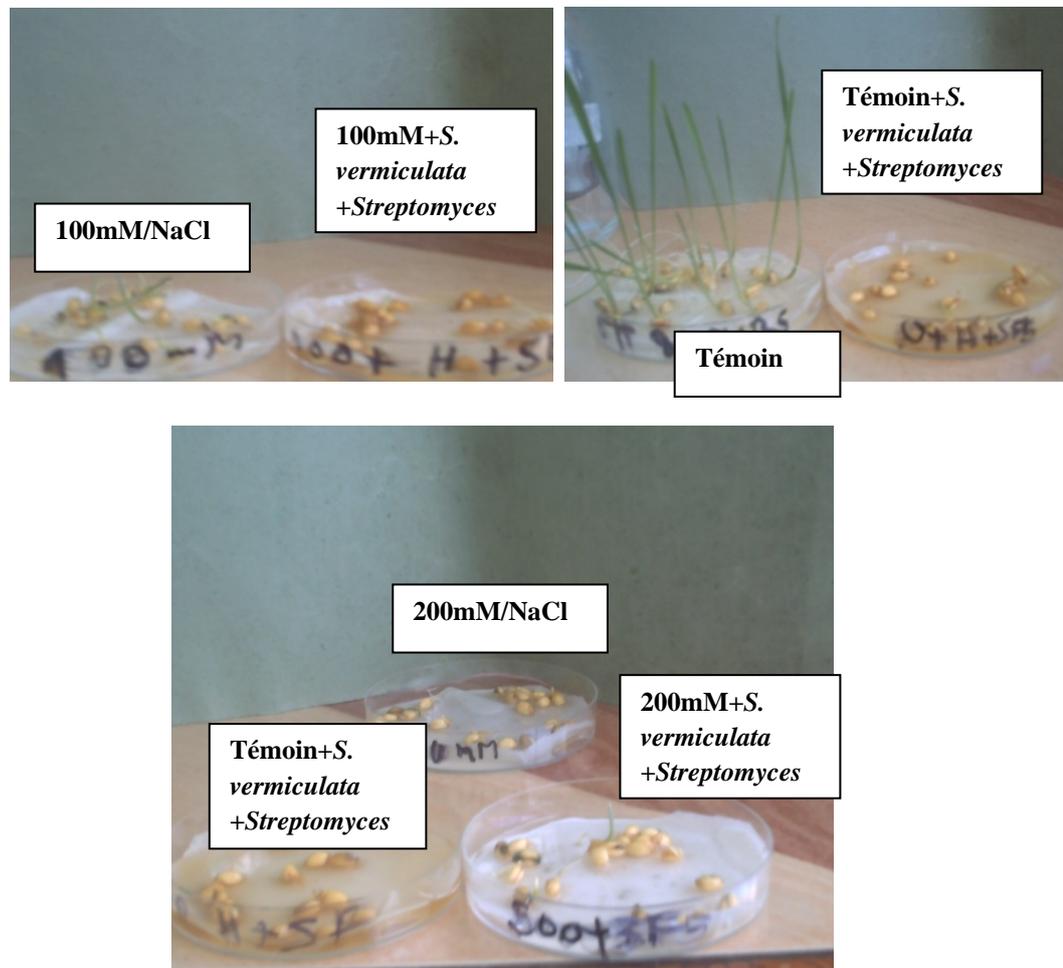


Fig. 53: Croissance de *Triticum durum* L. à NaCl (0, 100 et 200mM) en présence de *S. vermiculata*+*Streptomyces* sp. SF5

Les mêmes résultats sont obtenus pour la germination sur sol à des taux respectifs à 46.66%, 40.00% et 26.6% par rapport aux traitements 1 (100%), 5 (80 %) et 9 (53.2%) (Fig. 54). Les composés phénoliques agissent *per se* comme inhibiteurs de la croissance des plantes. Ils exercent une action compétitive vis-à-vis d'autres inhibiteurs comme l'acide abscissique. Leur interaction maintient la croissance végétale comme celle de *Amaranthus caudatus* (Ray *et al.*, 1980). La combinaison de l'acide abscissique et certains composés phénoliques (acides salicylique, cinnamique et ferrulique) conduit au même effet

antagoniste. L'acide abscissique inhibe l'activité amylasique de *Triticum aestivum* L., son interaction avec ces composés phénoliques contrecarre l'effet inhibiteur de celui-ci, ce qui a comme conséquence de réguler la germination des graines (Sharma *et al.*, 1986). Les acides *trans*-cinnamique, salicylique, tannique et la couramine, exercent un effet réverse sur l'abscission induite par l'acide abscissique constituant ainsi un moyen de régulation de ce processus (Apte et Laloraya, 1981).

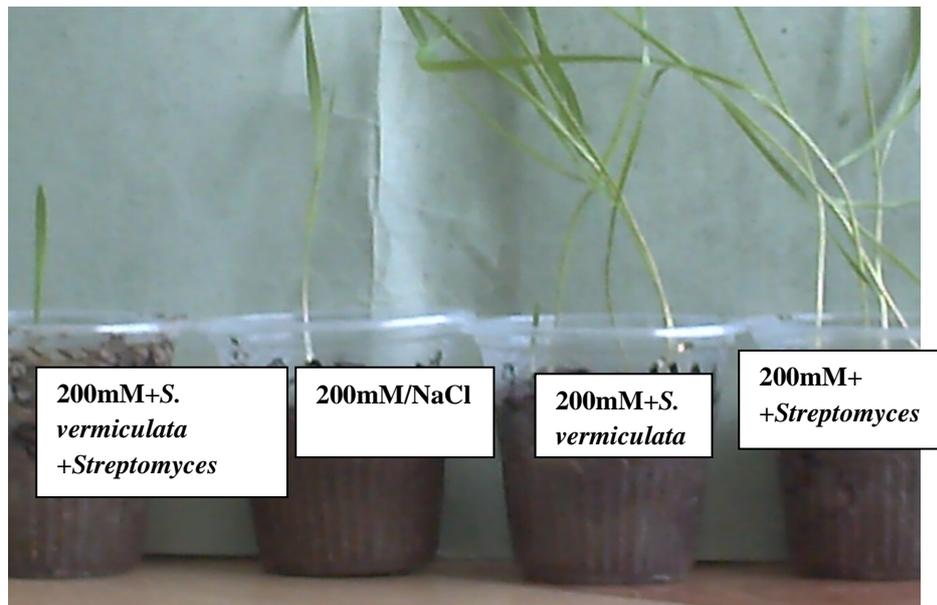


Fig. 54 : Croissance de *Triticum durum* L. en présence NaCl/200mM, de *Streptomyces* sp. SF5+200mM, de *S. vermiculata*+200mM et *S. vermiculata*+ *Streptomyces* sp.+ 200mM.

Nos résultats confirment l'effet inhibiteur de la combinaison de *Streptomyces* sp. SF5 et *Salsola vermiculata* sur la germination des graines de *Triticum durum* L. *Streptomyces* sp. SF5 accumule l'acide indole acétique. Sous l'action antagoniste des composés phénoliques éventuellement synthétisés par l'halophyte, un effet inverse de l'action stimulatrice de l'AIA a eu lieu. Pour cette raison, une inhibition de la germination des graines du blé est observée, elle est plus accentuée par rapport aux échantillons additionnés de NaCl (100 et 200 mM). Chez *Amaranthus caudatus*, l'action antagoniste des composés phénoliques permet de maintenir une stimulation par l'acide abscissique ou une inhibition par l'acide gibbérellique des hormones végétales (Ray et Laloraya, 1984).

Streptomyces sp. SF5 améliore la germination, l'effet stimulateur est plus évident en présence de NaCl/200 mM. Les taux de germination des graines cultivées dans l'eau distillée additionnée de 100 et 200 mM/NaCl sont de 85% et 68.3% par rapport aux

traitements 5 (83.3%) et 9 (53.3%) (Fig. 55). Sur sol, ils sont de 93.2% (200 mM) et 86.6% (100 mM) contrairement aux traitements 5 (80%) et 9 (53.2%) (Fig. 52 et 54).

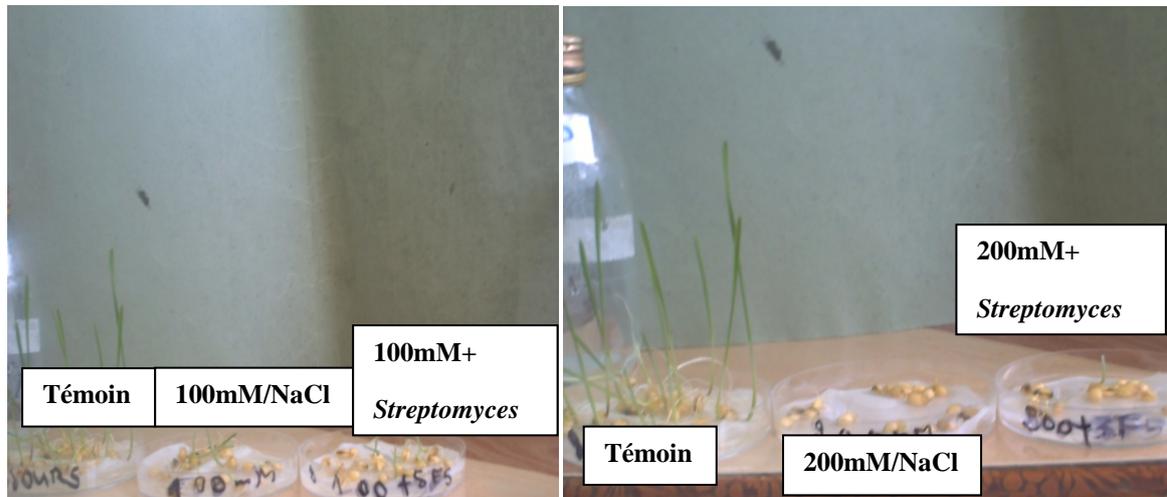


Fig. 55 : Croissance de *Triticum durum* L. à NaCl (100 et 200mM) en présence de *Streptomyces* sp. SF5

Les bactéries associées aux plantes stimulent la croissance végétale par l'augmentation de la disponibilité de l'azote, la synthèse de phytohormones (auxines et cytokinines), la solubilisation des minéraux, etc... (Bowen et Rovira, 1999 ; Zaki et Radwan, 2011). La germination et la croissance de nombreuses espèces végétales sont améliorées dans des conditions normales ou de stress en apportant des phytohormones-auxines et gibbérellines- ou d'autres substances organiques (Datta et Basu, 2000 ; Balestri et Bertini, 2003 ; Ashraf et Foolad, 2005). Les actinomycètes dont le genre *Streptomyces* sont impliquées dans la stimulation de la croissance des plantes par la production de phytohormones telles les auxines et l'acide gibbérellique. L'acide indole acétique est la principale forme des auxines responsable de la régulation de nombreux processus cellulaires : la division, l'élongation et la différenciation. L'application exogène de l'AIA stimule non seulement la croissance végétale mais améliore également le contenu en protéines (Hussein *et al.*, 2011), le développement et la prolifération des racines augmentant ainsi la capacité d'absorption de l'eau et des nutriments (Ashrafuzzaman *et al.*, 2009). Cette auxine est impliquée dans l'induction de la réponse des plantes au stress, elle déclenche l'expression des enzymes antioxydantes et augmente la tolérance aux stress oxydatif et salin (Pedranzani *et al.*, 2003). D'un autre côté, chez *Triticum aestivum* L., l'application de l'AIA minimise les effets adverses des métaux lourds toxiques contenus dans les eaux d'irrigation (Kumar *et al.*, 2011).

Les longueurs des racines et des tiges sont les paramètres les plus importants dans l'étude de la réponse des plantes au stress salin puisque les racines sont en contact direct avec le sol et absorbent l'eau et les autres éléments ; les tiges les distribuent au reste de la plante (Jamil et Rha, 2004). L'effet inhibiteur est plus prononcé à 200 mM/NaCl. La taille des racines diminue par 2.12 et 5.96 fois, celle des tiges est réduite par 5.51 et 16.88 fois (100 et 200 mM/NaCl).

Sur sol, la longueur et le poids sec des racines et des tiges sont moins affectés par le sel. Les longueurs sont réduites respectivement par des facteurs de 1.15 et 2 fois (racines) et 1.09 et 2.08 fois (tiges) (100 et 200 mM), quant au poids sec, les facteurs de réduction sont de 1.12 et 1.75 fois (racines) et 1.12 et 2.68 fois (tiges) (100 et 200mM). La réduction du développement des racines et des tiges serait due aux effets toxiques des teneurs élevées de NaCl et au déséquilibre de la disponibilité en nutriments (Datta *et al.*, 2009). Le stress salin inhibe fortement la croissance de la coléoptile, celle des racines est moins affectée (Keiffer et Ungar, 1997; Foolad, 1996). Cet effet a été reporté chez trois espèces de cucurbites tropicales, il est plus prononcé au niveau des parties aériennes par rapport à celles des racines (Taffouo *et al.* 2008). Dans des conditions naturelles (absence de sel), les longueurs de la coléoptile et des racines de deux variétés de *T. aestivum* L. (Rowshan et Dez) sont 24.07 mm et 37.36 mm respectivement. En présence de NaCl, elles sont réduites par 67.73% et 34.45% (Maghsousi et Maghsoudi, 2008).

En présence de *S. vermiculata*, les longueurs des racines et des tiges (traitements 2, 6 et 10) des graines germées dans l'eau distillée sont réduites par 2.73, 3.31 et 16.18 fois (racines) et 2.44, 6.54 et 41.54 fois (tiges) par rapport au traitement 1. L'halophyte qui accumule probablement certains composés toxiques dont les composés phénoliques inhibant la croissance de *T. durum* est observé uniquement pour les graines germées dans l'eau distillée et non pas sur sol, ceci serait dû à la nature du milieu. Dans l'eau distillée, les conditions de germination et de croissance sont différentes à celles du sol, celui-ci constitue un milieu riche en matière minérale et organiques permettant un bon développement aux plantes. De plus les composés phénoliques synthétisés par *S. vermiculata* peuvent être chélatés ou dégradés par certains composés du sol supprimant ainsi leurs effets délétères sur la croissance de *Triticum durum* L.

S. vermiculata améliore considérablement le poids sec des racines et des tiges par des facteurs respectifs à 2.12, 2.17 et 1.80 fois (racines) et 1.23, 1.70 et 3.47 fois (tiges)

pour les traitements 2, 6 et 10 par rapport aux traitements 1, 5 et 9. Les longueurs sont augmentées respectivement par des facteurs de 1.56, 1.23, 2.26 fois (racines) et 1.03, 1.17 et 2 fois (tiges). Les halophytes constituent une source de matière minérale et organique favorisant ainsi la croissance végétale. Chez *Kochia sieversiana*, par exemple, de nombreuses solutés (Na^+ , K^+ , Ca^{+2} , Mg^{+2} , Cl^- , SO_4^{-2} , NO_3^- , H_2PO_3^- , glycine bétaine, proline, sucres solubles, et acides organiques) ont été déterminées (Yang *et al.*, 2007). D'autres telles que, *Suaeda* sp., *Acacia* sp., *Salicornia* sp., *Pandanus tectorius*, *Glycyrrhiza uralensis*, *Asparagus persicus* contiennent de l'amidon, des sucres et des protéines. *Salsola imbricata* et *S. soda* renferment des ions : Na^+ , K^+ , Ca^{+2} , Fe^{+2} , Cu^{+2} et Zn^{+2} (Zhao *et al.*, 2011). Ces éléments minéraux et organiques jouent un rôle extrêmement important pour la nutrition des plantes.

La combinaison de *S. vermiculata* et *Streptomyces* sp. retarde l'élongation des racines (4.35, 7.58 et 30 fois) et des tiges (3.61, 18.06 et 52.4 fois) des graines germées dans l'eau distillée : traitements 4, 8 et 12 par rapport au témoin. Sur sol, le poids sec et la longueur des racines et des tiges sont diminués (2.10, 2.47, 7 fois et 1.04, 1.36 et 5.13 fois, racines) et (1.27, 1.32, 6.52 fois et 1.28, 1.30 et 4.74 fois, tiges) pour les mêmes traitements. Cette inhibition est due à l'action antagoniste des composés phénoliques accumulés par l'halophyte qui reversent ainsi l'action stimulatrice de l'AIA. Des résultats similaires de cet effet ont été rapportés (Ray *et al.*, 1980 ; Sharma *et al.*, 1986) par la combinaison de l'acide abscissique (inhibiteur) avec certains composés phénoliques constituant ainsi un moyen de régulation de la croissance végétale .

Streptomyces sp. SF5 stimule fortement l'allongement des racines et des tiges. Chez *Triticum aestivum* L. l'AIA accélère leur émergence et favorise leur croissance (Akbari *et al.*, 2007). Les longueurs des racines et des tiges des graines germées dans l'eau distillée sont stimulées (x1.10, x1.17, x1.81, x1.02, x1.11 et x2.29 fois): traitements 3, 7 et 11 par rapport aux n° 1, 5 et 9. Sur sol, le poids sec et les longueurs des racines et des tiges sont améliorés (x1.08, x2.90, x1.58 fois et x1.37, x1.15 et x2.36 fois, racines) et (x1.25, x1.78, x2.57 fois et x1.04, x1.08 et x1.70 fois, tiges). L'AIA influence plusieurs paramètres physiologiques chez la plante, à savoir l'élongation et la division cellulaire, la dormance apicale, la différenciation des tissus vasculaires, la production d'éthylène, l'initiation racinaire (Keyeo *et al.*, 2011) et la prolifération racinaire aboutissant ainsi à une meilleure disponibilité en eau et en nutriments (Rekoslavskaya *et al.* 1999 ; Ashrafuzzamann *et al.*, 2009).

D'un autre côté, notre étude a eu comme objectif d'analyser l'effet du NaCl sur l'accumulation de la proline, des pigments chlorophylliens et des caroténoïdes. La proline est fortement accumulée en présence de NaCl (100 et 200 mM, x22,85 et x10). Selon Vendruscolo *et al.* (2007) et Shafi *et al.* (2011), des concentrations élevées en proline sont observées chez le blé cultivé dans des conditions de stress hydrique et oxydatif. La synthèse de la proline est une mesure adaptative des plantes et sa teneur est corrélée à la tolérance au NaCl, ses taux augmentent chez trois espèces végétales ornementales (*Zinnia elegans*, *Tagetes patula* et *Petunia hybrida*) (Driouich *et al.*, 2001) et chez plusieurs variétés de blé (El Jaafari, 1993) en présence de concentrations excessives de NaCl. Selon Steward (1981), la synthèse de la proline consécutive à un stress est à la fois le résultat d'une diminution de la synthèse protéique et d'une reconversion du glutamate en proline. Des concentrations très faibles en proline sont obtenues en absence de NaCl et en présence de *S. vermiculata* et *Streptomyces* sp. SF5. En général, des teneurs faibles de cet osmolyte sont observées en présence de concentrations faibles de NaCl (Ayala-Astorga et Alcaraz-Meléndez, 2010). De plus, *S. vermiculata* et *Streptomyces* sp. abaissent les taux de proline en présence de 100 et 200 mM de NaCl, ceci peut être attribué à un effet antagoniste entre celle-ci et certains osmoprotecteurs synthétisés par l'halophyte (glycine bétaine ou autres) ou l'acide indole acétique produit par *Streptomyces* sp. Ceux-ci agissent certainement sur certains gènes codant pour la synthèse de la proline, inhibant ou minimisant son accumulation.

Le NaCl affecte aussi la photosynthèse réduisant ainsi la croissance et la production végétale. La fluorescence chlorophyllienne constitue l'un des paramètres importants dans l'halotolérance des plantes (Denden *et al.*, 2005). Les concentrations en chlorophylles a et b sont sensiblement atténuées à 200 mM (3.41 et 2.57 fois) par rapport à 100mM (1.28 et 1.08 fois). Chez le blé, par exemple, le stress salin perturbe de nombreux processus physiologiques dont la photosynthèse (Gobinathan *et al.*, 2009). Les effets délétères du NaCl sur la sénescence des feuilles sont liés à l'accumulation des ions toxiques (sodium et chlore) et à la diminution de l'absorption des ions Mg^{+2} affectant ainsi le contenu en chlorophylle (Leidi *et al.*, 1991). La diminution des teneurs en chlorophylle est due à la peroxydation des lipides au niveau des membranes des chloroplastes, à la formation des hydro-péroxydes des acides gras et à l'augmentation de l'activité des chlorophyllases (Jaleel *et al.*, 2007). Le stress salin diminue non seulement le contenu en chlorophylle totale, mais il augmente également le rapport chlorophylle $a:b$, conséquence de la

dégradation de la chlorophylle b et sa conversion en chlorophylle a (Loggini *et al.*, 1999). La diminution du contenu en chlorophylle dans des conditions salines a été rapportée par Iqbal *et al.* (2006), Ashraf *et al.* (2005) et Khan *et al.* (2009). L'addition de *S. vermiculata* améliore la fluorescence chlorophyllienne, les teneurs en chlorophylles a et b et totale sont augmentés par (x1.17, x1.04 et x1.12, 100 mM/NaCl) et (x2.17, x2.5 et x2.31, 200 mM/NaCl). La synthèse de la chlorophylle dépend de la nutrition minérale -azote, phosphore et potassium- (Bojovic et Stojanovic, 2005). La rhizosphère de certaines halophytes constitue une source de matière minérale, chez *Salsola nitraria* Pall., par exemple, les teneurs totales en azote, en phosphore et en potassium sont respectivement de 0.37, 0.733 et 15.09 g/Kg (Liangpeng *et al.*, 2007). Par conséquent, *S. vermiculata* apporte seulement une source d'osmoprotection vis-à-vis les effets délétères du NaCl, mais aussi une source nutritionnelle minérale participant ainsi à la synthèse de la chlorophylle.

Une amélioration des teneurs en chlorophylles a, b et totale est aussi observée suite à l'addition de *Streptomyces* sp : (x1.17, x1.21 et x1.19, 100mM/NaCl) et (x1.41, x1.21 et x1.32, 200mM/NaCl). L'AIA synthétisé par *Streptomyces* semble avoir un rôle dans la protection du système photosynthétique de *Triticum durum* L. par l'augmentation de la disponibilité et la solubilisation des éléments minéraux impliqués dans la synthèse des pigments chlorophylliens.

En présence de NaCl (100 et 200 mM), les teneurs en caroténoïdes diminuent (1.08 et 1.16 fois). Chez *Paulownia imperialis* et *P. fortunei*, les teneurs en β -carotène diminuent significativement en présence de concentrations croissantes de NaCl (0, 20, 40, 60, 80 et 160 mM) (Ayala-Astorga et Alcaraz- Meléndez, 2010). Par contre, chez *Atriplex centralasatica*, les concentrations en chlorophylles a et b et en β -carotène restent inchangées en augmentant les concentrations de NaCl (Qiu *et al.*, 2003). Il est bien établi que les caroténoïdes sont impliqués dans la protection du système photosynthétique vis-à-vis de l'endommagement oxydatif causé par la salinité (Gadalla, 2009). La réduction des teneurs de caroténoïdes semble avoir un effet dans la diminution de celles des chlorophylles a, b et totale. *S. vermiculata* et *Streptomyces* ont participé sans doute à l'augmentation des teneurs en caroténoïdes. Ceci serait dû à l'induction de certaines enzymes nécessaires pour la synthèse de ces derniers. La tolérance au sel pourrait être améliorée si les espèces oxygénées réactives (EOR) sont éliminées. Afin de prévenir les détériorations causées par les EOR, les plantes ont développé des mécanismes de détoxification multiples dont la synthèse de certaines molécules anti-oxydantes tels que les

α -tocopherols et les caroténoïdes protégeant ainsi les lipides membranaires vis-à-vis du stress oxydatif (Falk et Munné-Bosch, 2010). Il est à noter que la combinaison de *S. vermiculata* et *Streptomyces* sp. SF5 exerce une action antagoniste sur les teneurs de proline, des chlorophylles a, b et totale et de caroténoïdes dépassant fortement l'effet inhibiteur du stress salin.

L'étude statistique des composantes principale (ACP) a montré que les différents paramètres sont influencés par le degré de la salinité. En absence de NaCl, tous ces derniers sont corrélés, néanmoins les valeurs du traitement 4 (témoin +*S. vermiculata*+*Streptomyces* sp. SF5), c'est à dire les valeurs 11, 12 et 13 sont négatives, ce qui confirme l'effet négatif de la combinaison de l'halophyte et la souche bactérienne sur tous les paramètres étudiés. Les valeurs 1, 2 et 3 (témoin) sont inférieures à celles des autres valeurs (traitements additionnés de *S. vermiculata* ou de *Streptomyces* sp.), ceci permet de dire que tous les paramètres sont positivement influencés par l'addition de l'halophyte et la souche bactérienne. En présence de 100 mM/NaCl, les teneurs en chlorophylles a, b, totale et en caroténoïdes, les longueurs et le poids sec des tiges et des racines sont corrélés. Cependant la proline et le taux de germination ne sont pas liés aux autres paramètres. En présence de stress salin, la teneur en proline augmente tandis que les valeurs des autres paramètres chutent. De plus le taux de germination n'est pas fortement inhibé par une teneur saline de 100 mM, le blé est considéré comme moyennement halotolérant. A 200 mM/NaCl, tous les paramètres étudiés sont liés excepté, celui de la proline. Cet osmoprotecteur est accumulé en cas de stress salin. Contrairement aux résultats obtenus à 100mM, dans ce cas, le taux de germination est fortement inhibé à une teneur de 200 mM/NaCl. Toutes les valeurs sont positives sauf celles des traitements 9 (200 mM, valeurs 4, 5 et 6) et 12 (200 mM+ *S. vermiculata*+*Streptomyces* sp., valeurs 13, 14 et 15).

DISCUSSION

GENERALE

Discussion générale

Sept souches actinomycétales (SF1, SF2, SF3, SF4, SF5, SF6 et SF7) ont été isolées sur milieu amidon-caséine, celui-ci contient des substrats sélectifs favorisant leur croissance (amidon et caséine). Il permet l'isolement des *Streptomyces* (Hagedorn, 1976) et des genres d'actinomycètes rares tels que ; *Actinomonospora*, *Actinopolyspora* et *Planomonospora* (Suzuki, 2001). La sélection des actinomycètes doit être destinée à réduire le développement des micro-organismes compétitifs (Hayakawa, 2008). L'utilisation des antibiotiques agents de l'inhibition sélective des bactéries, serait un appui extrêmement utile (Porter *et al.* 1960). Le traitement thermique du sol (60°C/60 min) et l'acide nalidixique réduisent significativement le nombre des bactéries à Gram négatif (Vijayakumar *et al.*, 2007).

La sélection des souches actinomycétales produisant l'AIA et possédant des effets antagonistes contre des souches microbiennes pathogènes a révélé la capacité de la souche SF5 du sol et celle de référence *Nocardiosis* sp. MADO3 à accumuler des teneurs élevées en AIA (55,58 et 39,38µg/ml). Selon Narayana *et al.* (2007), les actinomycètes isolées de la rhizosphère de certaines plantes médicinales dont le genre *Streptomyces* produisent l'AIA à des teneurs variant de 11- 144 µg/ml. De nombreuses espèces de *Pseudomonas* en produisent à des taux de 20- 36 µg/ml (Khamna *et al.*, 2010). D'autre part, *Streptomyces* sp. MADO2, *Nocardiosis* sp. MADO3 et la souche SF5 sont douées d'activités antibactérienne et antifongique. Les actinomycètes sont à l'origine de 70% des antibiotiques naturels connus dans le monde, principalement ceux appartenant au genre *Streptomyces* (da Silva Sousa *et al.*, 2008). Sur 356 espèces de *Streptomyces* isolés, 36% des isolats possèdent des activités antibactériennes contre *Staphylococcus aureus* (20.78%), *E. coli* (2.52%), *Micrococcus luteus* (18.25%), *Mycobacterium smegmatis* (22.47%) et *Bacillus subtilis* (12.07%) (Denizci, 1996).

Le L-tryptophane à différentes concentrations (2, 5 et 7mg/ml) exerce un effet hétérogène sur la production et la croissance de l'AIA chez *Nocardiosis* sp. MADO3 et la souche SF5. 5 mg/ml est favorable pour la production de l'AIA chez la souche SF5 (104,76µg/ml). En revanche, 2 mg/ml constitue la teneur optimale chez *Nocardiosis* sp. MADO3 (39,45 µg/ml). Le L-tryptophane à 2mg/ml est considéré comme la concentration la plus appropriée pour la production de l'AIA chez *Streptomyces* CMU-H009, cependant à des teneurs élevées l'accumulation de cette phytohormone pourrait être inhibée (Khamna *et al.*, 2010). La croissance des deux souches est optimale en présence de 2mg/ml de L-tryptophane. Des teneurs de 5 et 7mg/ml ralentissent le développement bactérien. D'autre part, un pH de 7

est optimal pour la croissance et la production de l'AIA. Selon Shirokikh *et al.* (2007), un pH acide ou basique est défavorable pour la production de l'AIA puisque les espèces d'actinomycètes croissent lentement dans ces conditions. La croissance de la souche SF5 et de *Nocardiosis* sp. MAD03 est ralentie respectivement par des facteurs de 1.46, 1.11 fois (pH=5), 2.30 et 2.06 fois (pH=9). La production est réduite par des facteurs de 1.80, 1.52 fois (pH= 5), 2.65 et 1.87 fois (pH=9). Une relation étroite existe entre la croissance et la production de l'AIA. Le pH affecte la fonction des systèmes enzymatiques et la solubilité de nombreuses substances importantes pour le développement bactérien.

30°C est une température optimale pour la production de l'AIA et le développement des deux souches. A 30°C, *Streptomyces* CMU H009 accumule des taux importants de cette auxine (Khamna *et al.*, 2010). La croissance est diminuée à 37°C par des facteurs respectifs à 1.18 (SF5) et 1.84 fois (*Nocardiosis* sp). La production de l'AIA est réduite par des facteurs de 2.08 (SF5) et 1.61 fois (*Nocardiosis* sp.). Selon Aldesuquy *et al.* (1998), des températures allant de 25-30°C sont favorables pour la croissance et la production de l'AIA chez *Streptomyces* sp.

Le NaCl aux diverses teneurs utilisées inhibe la croissance de la souche SF5. Elle est diminuée par des facteurs de 1.80 (500mM) et 1.18 fois (300mM). En revanche, un optimum de croissance à 500 mM/NaCl est observé chez *Nocardiosis* sp. MAD03 qui exige une teneur de NaCl de 3% pour son développement. Cependant, la production de l'AIA est réduite chez les deux souches (principalement à 500 mM/NaCl), les facteurs de réduction sont respectivement de 2.20 (SF5) et 2.09 fois (*Nocardiosis* sp.).

La souche SF5 accumule l'AIA en teneurs importantes et produit des substances antimicrobiennes. Ses colonies matures sont sèches, poudreuses et à bords plats, cette forme est caractéristique à celles du genre *Streptomyces* (Petrosyan *et al.*, 2003). Elles ont des contours réguliers, la couleur du mycélium aérien est blanche, celle du mycélium végétatif est jaune. Les colonies ont une odeur du sol caractéristique de *Streptomyces* (Locci, 1989). En se basant sur les caractères morphologiques et culturels (Locci, 1989), cet isolat est désigné comme étant *Streptomyces*.

Dans cette étude, la mise en évidence de l'effet du degré de la salinité et la nature du milieu de culture sur le développement de *Streptomyces* sp. MAD02 et *Nocardiosis* sp. MAD03 a été réalisé. En absence de NaCl, la croissance de *Streptomyces* sp. est optimale sur milieux ISP5 et M63 : le glucose et le glycérol ont servis comme sources de carbone. En

revanche, *Nocardiopsis* sp. se développe favorablement sur M63 : le glucose a constitué la meilleure source de carbone.

En présence d'osmolarités élevées, *Streptomyces* sp. MADO2 et *Nocardiopsis* sp. MADO3 se comportent comme des halophiles modérés. Les actinomycètes halophiles sont regroupées selon leurs exigences en sel par la méthode de classification proposée par Kashner, (1978). *Streptomyces* sp. est plus sensible au stress salin que *Nocardiopsis* sp. (optimum de croissance à 0.5 M/NaCl) qui exige une teneur de NaCl de 3% pour son développement. Par contre, *Streptomyces* sp. a besoin seulement de 0.58% de NaCl. La croissance de *Nocardiopsis* sp. est importante en M63, ceci peut être expliqué par l'accumulation du tréhalose à partir du glucose (ingrédient du M63). Ce milieu contient 10mM de glucose nécessaire aux cellules stressées pour synthétiser le tréhalose comme osmoprotecteur. Selon McBride and Ensign, (1987), les spores de *Streptomyces griseus* cultivées sur milieu DMC additionné respectivement de 200 et 20 mM de glucose contiennent 21% et 1.2% de leurs poids sec en tréhalose. En présence de 1 M/NaCl, le développement de *Streptomyces* sp. et *Nocardiopsis* sp. est inhibé dans les deux milieux. Cependant, une légère croissance est observée sur milieux M63 et ISP5 respectivement pour *Streptomyces* sp. et *Nocardiopsis* sp : les deux bactéries ont probablement synthétisé des osmolytes afin de réguler leur réponse au stress osmotique.

A 0.1 M/NaCl, la croissance de *Nocardiopsis* sp. est inhibée en ISP5 en présence de GB et est stimulée par la proline et le tréhalose. L'effet inhibiteur de ces trois osmolytes est aussi observé chez *Streptomyces* sp. en ISP5 et M63, seul le tréhalose (M63) restaure le développement bactérien. L'effet inhibiteur de la GB et de la proline et du tréhalose sur la croissance bactérienne ne dépend pas seulement du degré de la salinité (osmolarité faible) mais également de la nature du milieu de culture. Les mêmes constatations concernant cet effet ont été rapportées par Moleenar *et al.* (1993), Glaasker *et al.* (1996) et Kets *et al.* (1997) où la GB et d'autres osmoprotecteurs exercent une action inhibitrice sur la croissance de *Lactococcus lactis*. Les principaux résultats confirment l'effet osmoprotecteur et inhibiteur de la GB, de la proline et du tréhalose sur la croissance de *Streptomyces* sp. et *Nocardiopsis* sp. respectivement à des concentrations salines inhibitrices et à de faibles osmolarités. La glycine bêtaïne est généralement considérée comme l'osmolyte de choix chez *E. coli*, son pouvoir osmoprotecteur est constaté à des teneurs élevées en sucres, en sels et en acides organiques (Csonka, 1989; Miller et Ingram, 2007).

Salsola vermiculata, la GB, la proline et le tréhalose restaurent efficacement la croissance de *Streptomyces* sp. SF5 et de *Streptomyces* sp. MADO2 en présence de teneurs croissantes de NaCl. Toutefois, l'effet osmoprotecteur diffère selon le degré de la salinité, la souche bactérienne et le milieu de culture. *Streptomyces* sp. SF5 utilise favorablement le glucose (M63) par rapport au glycérol (ISP5). Les numérations sont de $6.8.10^7$, $3.9.10^7$, $3.4.10^4$ et $2.5.10^3$ UFC/ml respectivement en présence de 100, 500, 800, et 1000 mM/NaCl. La croissance de *Streptomyces* sp MADO2. est optimale dans les deux milieux où le glucose et le glycérol ont servis comme sources de carbone, quant à *Streptomyces* sp. SF5, le glucose a constitué la meilleure source de carbone.

La croissance de *Streptomyces* sp. SF5 est diminuée par des facteurs respectifs à $2.05.10^3$ et $2.8.10^4$ fois (M63) et $9.7.10^3$ et $3.5.10^4$ fois (ISP5) en présence de 800 et 1000 mM /NaCl, celle de *Streptomyces* sp. MADO2 est réduite par 10^3 fois (ISP5) et $3.5.10^3$ fois (M63)/800 mM. L'action inhibitrice du NaCl est notoire principalement à de fortes osmolarités (800 et 1000 mM), cependant la restauration de la croissance est expliquée par l'osmoprotection apportée par les ingrédients des milieux de culture : M63 (glucose convertis en tréhalose) et ISP5 qui contient du glycérol. En réponse aux osmolarités élevées, les microorganismes accumulent des acides aminés (glutamate et proline), des sucres (tréhalose, saccharose et glycérol) et des composés oniums-méthylés (glycine bétaine et diméthylsulfopropionate -DMSP-) (Csonka, 1989).

La croissance de *Streptomyces* sp.SF5 et *Streptomyces* sp.MADO2 est sensiblement améliorée par l'apport de *S. vermiculata* principalement en M63. *Streptomyces* sp. MADO2 répond favorablement à l'halophyte : cette bactérie a probablement trouvé un milieu identique à son site de prélèvement (éponges marines). De plus, les halophytes constituent une source de matière minérale et organique : Na^+ , K^+ , Ca^{+2} , Mg^{+2} , Cl^- , SO_4^{-2} , NO_3^- , H_2PO_3^- , glycine bétaine, proline, sucres solubles et acides organiques (Yang *et al.*, 2007) stimulant ainsi le développement bactérien.

L'action de *S. vermiculata* sur *Streptomyces* sp. SF5 est plus importante en M63 et le degré de capacité osmoprotectrice est proportionnel à la concentration saline. D'un autre côté, une interférence entre certains composés de l'halophyte avec d'autres du milieu de culture (ISP5) ont réduit probablement l'effet de *S. vermiculata*. De plus, la croissance de *Streptomyces* sp. SF5 serait affectée par un phénomène de compétition entre des constituants de l'halophyte et certaines enzymes ou molécules bactériennes. L'efficacité osmoprotectrice de *S. vermiculata* dépasse celle de la GB, de la proline et du tréhalose. Les Chenopodiaceae :

Salsola, *Atriplex*, *Halosarcia*, *Spinacia*, *Sarcocornia*, *Salicornia* accumulent la GB (Rhodes et Hanson, 1993) et des ions tels que le Ca^{+2} , le K^+ et le Mg^{+2} jouant un rôle extrêmement important dans l'ajustement osmotique (Yasseen et Abu-Al-Basal, 2010).

L'effet de la GB, de la proline et du tréhalose sur la restauration de la croissance bactérienne est également prouvé. De nombreuses études ont mis en évidence l'action osmoprotectrice de la GB sur le développement des microorganismes dans des milieux contenant 0.3-1 M/NaCl (Csonka, 1989; Csonka et Hanson, 1991). La GB accumulée par l'algue marine *Ulva lactuca* osmoprotège *E. coli* ZB4000 cultivée en M63 additionné de 0.85M/NaCl (Ghoul *et al.*, 1995). Cet osmolyte est l'osmoprotecteur le plus puissant chez *Streptomyces* sp. MADO2 et *Nocardiopsis* sp. MADO3 en présence de fortes teneurs salines.

En outre, l'effet de *Streptomyces* sp.SF5 et de *S. vermiculata* sur la germination et la croissance de *Triticum durum* L. est examiné en présence de 100 et 200 mM/NaCl tout en calculant les pourcentages de germination. La détermination des taux de germination est considérée comme l'une des méthodes les plus largement utilisées dans l'étude de l'halotolérance des plantes (Dantas *et al.*, 2005).

En absence de stress salin, le nombre de graines germées dans l'eau distillée et sur sol est respectivement de (19.66 : témoin (T1), 19 : témoin+*Streptomyces* sp.SF5 (T3) ; 5 (T1), 4.66 (T3) et 4.33 : témoin+*S. vermiculata* (T2). Les taux de germination sont respectifs à 98.3% et 100%. La germination dans des conditions de stress salin indique que les graines de la plupart des espèces végétales atteignent un niveau maximal de germination dans l'eau distillée (Ghoulam et Fares, 2001 ; Alatar, 2011). D'un autre côté, le sol constitue un milieu favorable pour la germination et la croissance des plantes. Il contient entre autres des composés minéraux tels que l'azote, le phosphore, le potassium, le calcium, le magnésium et le soufre. L'azote, le phosphore et le magnésium sont considérés comme des éléments constitutifs de la chlorophylle, ils sont impliqués dans la photosynthèse. Le soufre participe également dans la formation des pigments chlorophylliens et améliore la croissance racinaire et la production des graines. De plus, le sol est extrêmement riche en matière organique constitutive de débris végétaux morts, de polysaccharides microbiens et de cadavres d'animaux (Davet, 1996).

Le NaCl/100 mM affecte faiblement la germination: les taux sont de 83.3% (eau distillée) et 80% (sol). Le blé est généralement considéré comme moyennement tolérant au sel (Hamza, 1967) par rapport à l'orge (Maas, 1986) et au triticale (Touraine et Ammar, 1985). Le NaCl à teneurs faibles retarde le processus de germination mais ne réduit pas de façon

importante le taux de germination (Ayers et Westcot, 1985). De plus, les cellules de *Triticum durum* L. ont éventuellement synthétisé certaines molécules osmoprotectrices en réponse au NaCl. De nombreuses espèces végétales accumulent des osmolytes (proline) protégeant ainsi les enzymes et les macromolécules vis-à-vis les effets délétères du sel (Mateo *et al.*, 2004). En présence de 200 mM/NaCl, l'action inhibitrice du NaCl sur le nombre des graines germées est plus prononcée: eau distillée (53.3%), sol (53.2%). La diminution des taux de germination serait due à un processus de dormance osmotique développé dans ces conditions de stress. D'un autre côté, certaines enzymes impliquées dans la germination notamment l' α -amylase sont influencées par le stress salin qui détruit leurs structures (Saboury et Karbassi, 2000). Le NaCl réduit de façon appréciable les taux de germination de nombreuses plantes, chez *Abelmoschus esculents* L. par exemple, le pourcentage de germination est réduit par 20% en présence de fortes concentrations salines (Ben Dkhil et Denden, 2010). Les ions Na^+ réduisent la disponibilité des ions Ca^{+2} et K^+ ainsi que leur transport aux différentes parties de la plante en affectant la structure et la composition des organes végétatifs et reproductifs (Cerdà et Martinez, 1988). Le NaCl présent au niveau des racines dégrade certaines protéines impliquées dans la croissance des racines et des tiges (Khan et Gulzar, 2003).

Le NaCl exerce une action inhibitrice sur la germination des graines de *T. durum* principalement à 200 mM. Néanmoins, cet effet est plus accentué pour les graines germées dans l'eau distillée additionné de *S. vermiculata* seule ou combinée à *Streptomyces* sp. SF5. Les taux de germination à 0, 100 et 200 mM/NaCl sont respectivement : 86.65% (T2), 55% (T6) et 48.3% (T10) par comparaison aux traitements 1 (98.3%), 5 (83.3%) et 9 (53.3%). Certaines halophytes synthétisent des alcaloïdes cytotoxiques (Wu *et al.*, 1997) et des composés phénoliques précipitant les protéines (Zhu *et al.*, 1997). Les acides phénoliques monomériques sont toxiques pour les plantes et les microorganismes à des concentrations supérieures à 10^{-4} - 10^{-5} M (Whitehead *et al.*, 1982). Ils inhibent la germination et la croissance de nombreuses espèces végétales (Sharma *et al.*, 1986). *S. vermiculata* améliore considérablement les taux de germination des graines de blé cultivées sur sol en présence de sel (100 et 200mM: 86.6%) par rapport aux traitements 5 (80%, 100mM) et 9 (53.2%, 200mM). Cette halophyte accumule des composés Dragendorff-positif (glycine bétaine), ce composé-onium est universellement rencontré chez les Chenopodiaceae où il demeure un caractère consistant de l'halotolérance chez de nombreuses plantes (Grieve et Maas, 1984).

La combinaison de *S. vermiculata* et *Streptomyces* sp. SF5 affecte largement la germination. Toutefois, l'effet est plus prononcé en présence de NaCl, les taux de germination des graines cultivées dans l'eau distillée à 0, 100 et 200 mM/NaCl sont respectivement de 66.65%, 53.3% et 36.63% par comparaison aux traitements 1 (98.3%) 5 (83.3%) et 9 (53.3%). Les mêmes résultats sont obtenus pour les graines germées sur sol : les taux de germination sont de 46.66%, 40% et 26.6% par rapport aux traitements 1 (100%), 5 (80%) et 9 (53.2%). Ceci est dû à l'action inhibitrice des composés phénoliques et leur effet antagoniste sur l'AIA produit par *Streptomyces* sp. SF5 ce qui inverse l'action stimulatrice de cette auxine. Il en résulte une inhibition de la germination des graines du blé, elle est plus prononcée par rapport aux échantillons additionnés de NaCl (100 et 200 mM). Les composés phénoliques exercent la même action antagoniste vis-à-vis d'autres inhibiteurs comme l'acide abscissique, leur interaction permet de réguler la croissance végétale (Ray *et al.*, 1980). D'un autre côté, l'inhibition de l'activité amylasique de *Triticum aestivum* L. par l'acide abscissique est reversée suite à son interférence avec les composés phénoliques ce qui permet de rétablir la germination des graines (Sharma *et al.*, 1986).

Streptomyces sp.SF5 améliore nettement la germination des graines de *T. durum*, l'effet stimulateur est notoire en présence de NaCl (200 mM). Les taux de germination à 200 mM/NaCl sont respectivement de 68.3% (eau distillée) 93.2% (sol). Les actinomycètes dont le genre *Streptomyces* sont largement impliquées dans l'amélioration de la croissance des plantes par la production de phytohormones tels que les auxines et l'acide gibbéréllique. L'acide indole acétique permet la régulation de nombreux processus cellulaires : division, élongation et différenciation cellulaire (Hussein *et al.*, 2011).

Les longueurs des racines et des tiges de *T. durum* cultivé dans l'eau distillée sont diminuées par des facteurs de 2.12, 5.96 et 5.51 et 16.88 respectivement à 100 et 200 mM/NaCl. Celles des graines germées sur sol sont réduites par 1.15, 2 fois et 1.09 et 2.08 fois. Selon Jamil et Rha, 2004, ces deux paramètres sont très importants dans l'étude de la réponse des plantes au stress salin. Les racines sont en contact direct avec le sol et absorbent l'eau et les autres éléments et les tiges les distribuent aux différentes parties de la plante. Le poids sec est réduit par des facteurs de 1.75 et 2.68 (200mM/NaCl). Selon Datta *et al.* (2009), la réduction du développement des racines et des tiges est due aux effets toxiques du NaCl et au déséquilibre de la disponibilité des nutriments.

En présence de *S. vermiculata*, les longueurs des racines et des tiges (eau distillée) sont diminuées par des facteurs de 16.18 et 41.54 (200mM/NaCl+ *S.vermiculata*/ T10) par rapport au traitement 1. Les composés phénoliques accumulés par l'halophyte ont uniquement exercé des effets toxiques sur la croissance de *T. durum* L. cultivé dans l'eau distillée où les conditions de germination diffèrent à celles retrouvées au niveau du sol, considéré comme un milieu complexe et riche en matière minérale et organiques. De plus, les composés phénoliques synthétisés par *S. vermiculata* peuvent être complexés ou dégradés par certains composés du sol, supprimant ainsi leurs effets délétères sur le développement de *Triticum durum* L. Sur sol, *S. vermiculata* a restauré efficacement le poids sec des racines et des tiges : x2.12, x2.17, x1.80 et x1.23, x1.70 et x3.47. Les longueurs sont améliorées par des facteurs de 1.56, 1.23, 2.26 et 1.03, 1.17 et 2 fois. L'effet antagoniste de *S. vermiculata* et *Streptomyces* sp. SF5 est également évident sur la diminution considérable des longueurs des racines et des tiges. Celles-ci sont réduites par des facteurs de 30 et 52.4 fois (eau distillée) et 5.13 et 4.74 fois (sol). Le poids sec est diminué par 7 et 6.52 fois (traitement 12). Les longueurs des racines et des tiges sont améliorées par *Streptomyces* sp. SF5 qui accumule l'acide indole acétique: 1.81 et 2.29 fois (eau distillée) et 2.36 et 1.70 fois (sol). Le poids sec est augmenté par 1.58 et 2.57 fois (T11). Chez *Triticum aestivum* L, l'AIA accélère l'émergence des racines et augmente la croissance des tiges des graines germées. Il permet également d'améliorer les longueurs et le poids sec de la coléoptile (Rekoslavskaya *et al.*, 1999, Akbari *et al.*, 2007).

En présence de 100 et 200 mM/NaCl, la proline atteint des teneurs maximales de 45.3 et 20.31 µg/g de matière fraîche : soit 22.85 et 10 fois par comparaison au témoin. Selon Vendruscolo *et al.* (2007) et Shafi *et al.* (2011), des concentrations élevées de cet osmolyte sont accumulées chez le blé soumis aux conditions de stress hydrique et oxydatif. En général, des teneurs faibles en proline sont observées à des concentrations faibles de NaCl (Ayala-Astorga, 2010, Mademba *et al.*, 2003). D'un autre côté, *S. vermiculata* et *Streptomyces* sp. abaissent les taux de proline (100 et 200 mM/NaCl), ceci serait dû à un effet antagoniste entre certains osmoprotecteurs synthétisés par l'halophyte (glycine bétaine ou autres), ou l'AIA produit par *Streptomyces* sp. et la proline qui participent tous dans la restauration de la germination et la croissance de *T. durum* L. conduisant ainsi à une inhibition ou une réduction de la synthèse de cet osmolyte.

Le sel inhibe la photosynthèse et réduit par conséquent la croissance et la production végétale. L'accumulation de la proline et l'intensité de la fluorescence chlorophyllienne constituent des paramètres importants dans l'étude de l'halotolérance des plantes (Denden *et al.*,

2005). Les teneurs en chlorophylles a et b sont sensiblement diminuées principalement à 200 mM/NaCl (3.41 et 2.57 fois). Ceci serait la conséquence de la peroxydation des lipides au niveau des membranes des chloroplastes, à la formation des hydro-péroxydes des acides gras et à l'augmentation de l'activité des chlorophyllases (Ashraf *et al.*, 2005 ; Iqbal *et al.*, 2006 ; Jaleel *et al.*, 2007 ; Khan *et al.*, 2009). Celles-ci sont nettement multipliées (x2.17 et x2.5/ 200 mM) par l'addition de *S. vermiculata*. La synthèse de la chlorophylle dépend de la nutrition minérale : l'azote, le phosphore et le potassium constituent des éléments importants pour le processus de la photosynthèse (Bojovic et Stojanovic, 2005). *Salsola nitraria* Pall. par exemple, contient des teneurs totales en azote, en phosphore et en potassium respectives à 0.37, 0.733 et 15.09 g/Kg (Liangpeng *et al.*, 2007). Donc, *S. vermiculata* apporte non seulement une source d'osmoprotection mais également une source nutritionnelle minérale participant à la synthèse de la chlorophylle. D'un autre côté, *Streptomyces* sp. améliore efficacement les teneurs en chlorophylles a, b et totale (x1.41, x1.21 et x1.32 fois, 200 mM/NaCl+*Streptomyces* sp.). Ceci est certainement la conséquence de l'augmentation de la disponibilité et à la solubilisation des éléments minéraux impliqués dans la synthèse de la chlorophylle par l'acide indole acétique.

Les teneurs en caroténoïdes chutent en présence de NaCl/100 et 200 mM (1.08 et 1.16 fois). Ces derniers sont impliqués dans la protection du système photosynthétique vis-à-vis de l'endommagement oxydatif causé par la salinité (Gadalla, 2009). La réduction des taux de caroténoïdes aurait un effet dans la diminution des teneurs en chlorophylles a, b et totale. *S. vermiculata* et *Streptomyces* améliorent les concentrations en caroténoïdes, suite à l'induction probable de certaines enzymes impliquées dans leur synthèse. Selon Falk et Munné-Bosch, (2010) les plantes ont développé de nombreux mécanismes de détoxification causés par les espèces oxygénées réactives (EOR), les α -tocopherols et les caroténoïdes sont les plus impliqués dans la protection des lipides membranaires vis-à-vis du stress oxydatif. La combinaison entre *S. vermiculata* et *Streptomyces* sp. SF5 influence négativement les teneurs en proline, en chlorophylles a, b et totale ainsi que celles en caroténoïdes. Cet effet dépasse largement celui du stress salin.

L'étude des composantes principales (ACP) révèle une corrélation entre tous les paramètres. Néanmoins, la proline est le seul qui soit indépendant. Les teneurs en chlorophylles a, b et totale et en caroténoïdes, les longueurs et le poids sec des tiges et des racines ainsi que les taux de germination chutent en présence de stress salin (100 et 200mM) à l'exception de la concentration en proline qui augmente en réponse aux fortes salinités.

CONCLUSION

Conclusion

Les caractéristiques morphologiques et culturales des colonies de la souche SF5 ont permis de la rapprocher au genre *Streptomyces*.

Toutes les souches isolées produisent l'acide indole acétique mais à différents taux. *Streptomyces* SF5 est la plus performante ($55,58 \pm 0.7 \mu\text{g/ml}$). A 30°C , à $\text{pH}=7$ et en absence de NaCl, une teneur de 5mg/ml de L-tryptophane permet d'accumuler des teneurs importantes en AIA ($104,76 \pm 0.2 \mu\text{g/ml}$),

Streptomyces sp. MADO2, *Nocardiopsis* sp. MADO3 et *Streptomyces* sp. SF5 sont capables de produire des substances antimicrobiennes. Les trois souches sont actives sur la plupart des bactéries et des champignons pathogènes testées.

L'étude de l'effet du NaCl sur la croissance de *Streptomyces* sp. MADO2, *Nocardiopsis* sp. MADO3 et *Streptomyces* sp. SF5 révèle que ces souches sont des halophiles modérées. Le degré d'halotolérance varie selon la souche, la concentration en NaCl et la nature du milieu de culture.

En présence de concentrations élevées de NaCl, la glycine bétaine, la proline et le tréhalose agissent potentiellement sur la restauration de la croissance bactérienne. En effet, à de faibles osmolarités ils exercent un effet inhibiteur notoire. L'apport de *Salsola vermiculata* osmoprotège efficacement les cellules bactériennes, son action dépasse celle des trois osmoprotecteurs.

Concernant l'effet du NaCl (100 et 200mM), de *Streptomyces* sp. SF5 et de *Salsola vermiculata* sur la germination et la croissance de *Triticum durum* L. les résultats suivants sont à noter :

- Réduction des taux de germination et inhibition de la croissance du blé principalement à 200 mM.
- La combinaison entre *Streptomyces* sp. SF5 et *S. vermiculata* révèle une action antagoniste sur la germination et la croissance du blé dur. Cet effet inhibiteur est notoire et dépasse celui du NaCl.
- L'apport séparé de *S. vermiculata* ou de *Streptomyces* confère une puissance osmoprotection à *Triticum durum* L : augmentation des taux de germination et amélioration des longueurs et des poids sec des racines et des tiges, des teneurs en pigments chlorophylliens et en caroténoïdes.

- La proline atteint des teneurs de 45.3 et 20.31 μ g/g respectivement à 100 et à 200 mM. Celles-ci diminuent en présence de *S. vermiculata*, de *Streptomyces* sp. SF5 seules ou combinées.

Nos principaux résultats confirment le potentiel effet osmoprotecteur de la GB, de la proline et du tréhalose à concentrations salines inhibitrices. Néanmoins, à de faibles osmolarités ils inhibent sensiblement la croissance bactérienne. D'un autre côté, *Salsola vermiculata* et *Streptomyces* sp. appliqués séparément pourraient résoudre le problème de la salinité et améliorer ainsi les rendements agricoles. Cependant, leur action combinée inhibe fortement la germination et la croissance végétale, l'effet inhibiteur dépasse largement celui du stress salin.

Au terme de ce travail, divers aspects semblent importants à réaliser :

- Identifier la souche *Streptomyces* sp. SF5 par la caractérisation phénotypique et phylogénétique.
- Etudier l'effet des autres souches isolées sur l'amélioration de la croissance de *Triticum durum* L.
- Identifier les substances antibactériennes et antifongiques synthétisées par les différentes souches actinomycétales.
- Identifier les molécules osmoprotectrices synthétisées par *S. vermiculata* par les différentes méthodes d'analyse.

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

- Abdel-Hady, M. S., K. H. Fahmy, et H. M. Hassan. 2001. Wheat genotypics and somaclonal variation in relation with in vitro selection for salt tolerance. *Egypt J. Appl. Sci.* **16** (3): 68-93.
- Ahmad, F., I. Ahmad et M. S. Khan. 2005. Indole acetic acid production by the indigenous isolates of *Azotobacter* and fluorescent *Pseudomonas* in the presence and absence of tryptophan. *Turk. J. Biol.* **29**: 29-34.
- Akbari, G., S. A. M. Modares Sanavy et S. Yousef zadeh. 2007. Effect of auxin and salt stress (NaCl) on seed germination of wheat cultivars (*Triticum aestivum* L.). *Pak. J. Biol. Sci.* **10** (15): 2557-2561.
- Alexander, M. 1977. *Soil microbiology* (2nd edition), John Wiley and sons. New York.
- Alatar, A. A. 2011. Effect of temperature and salinity on germination of *Achillea fragrantissima* and *Moringa peregrina* from Saudi Arabia. *Afr. J. Biotechnol.* **10** (17) : 3393-3398.
- Aldesuquy, H. S., F. A. Mansour, et S. A. Abo-Hamed. 1998. Effect of culture filtrates of *Streptomyces* on growth and productivity of wheat plants. *Folia Microbiologica.* **43**: 465-470.
- Al-Khayri, J. M. 2002. Growth proline accumulation and ion content in sodium chloride-stressed callus of date palm. *In vitro Cellular and Development Biology-Plant.* **38** (1): 79-82.
- Al-Mansouri, M., J. M. Kinet et S. Lutts. 1988. Compared effects of sudden and progressive impositions of salt stress in three durum wheat (*Triticum durum* Desf.). *J. Plant Physiol.* **54**: 743-753.
- Ames, R. N., K. L. Mihara et G. V. Bethlenfalvy. 1987. The establishment of microorganisms in vesicular-arbuscular mycorrhizal and control treatment. *Biol. Fertil. Soils.* **03**: 217-223.
- Antai, S. et D. L Crawford. 1981. Degradation of softwood, hardwood, and grass lignocelluloses by two *Streptomyces* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **42**(2): 378-380.
- Apse, M. P., G. S. Aharon, W. A. Snedden, et E. Blumwald. 1999. Salt tolerance conferred by overexpression of a vacuolar Na⁺/H⁺ antiporter in *Arabidopsis*. *Science.* **285**: 1256-1258.

- Apte, P. V. et M. M. Laloraya. 1981. Inhibitory action of phenolic compounds on abscisic acid-induced abscission. *J. Exp. Bot.* **33** (4) : 826-830.
- Arifuzzaman, M., M. R. Khatun et H. Rahman. 2010. Isolation and screening of actinomycetes from Sundarlands soil for antibacterial activity. *Afr. J. Biotech.* **09**(9): 4615-4619.
- Ashraf, M. et T. McNeilly. 2004. Salinity tolerance in *Brassica* oilseeds. *Rit. Rev. Plant Sci.* **23** (2): 157-174.
- Ashraf, M. et M. R. Foolad. 2005. Pre-sowing seed treatment-ashotgun approach to improve germination, plant growth and crop yield under saline and non saline conditions. *Adv. Agro.* **88**: 223-271.
- Ashraf, M.Y., K. Akhtar, G. Sarwar et M. Ashraf. 2005. Role of rooting system in salt tolerance potential of different guar accessions. *Agronomy of sustainable development.* **25**: 243-249.
- Ashraf, M. et M. R. Foolad. 2007. Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. *Environ. Exp. Bot.* **59**: 206-216.
- Ashrafuzzamann, M., A. H. Farid, M. R. Ismail, M. A. Hoque, M. Z. Islam, S. M. Shahidullah, M. Sariah. 2009. Efficiency of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) of the enhancement of rice growth. *Afr. J. Biotech.* **08** : 1247-1252.
- Ayala-Astorga, G. I. et L. Alcaraz-Meléndez, 2010. Salinity effects on protein content, lipid peroxydation, pigments and proline in *Paulownia imperialis* (Siebols&zuccarini) and *Paulownia fortunei* (seemann & hemsley) grown in vitro. *Electron. J. Biotechnol.* **13** : 1-15.
- Ayaz, F. A., A. Kadioglu et R. Turgut, 2000. Water stress affects on the content of low molecular weight carbohydrates and phenolic acids in *Ctenanthe setosa* (Rose.) Eichler, *Can. J. Plant. Sci.* **80** : 373-378.
- Ayers, R. et W. Westcot, 1985. Water quality for agriculture. *Irrigation and Drainage. Paper N° 29*, FAO. Rome.
- Baatour, O., S. M'rah, N. Ben Brahim, F. Boulesnem et M. Lachaal. 2004. Réponse physiologique de la gesse (*Lathyrus sativus*) à la salinité du milieu. *Revue des régions arides*, tome 1, N° Spécial : 346-358.
- Balestri, E. et S. Bertini. 2003. Growth and development of *Posidonia oceanica* seedlings treated with plant growth regulators: possible implications for meadow restoration. *Aqua. Bot.* **76**: 291-297.

- Bano, N. et J. Musarrat. 2003. Characterization of a new *Pseudomonas aeruginosa* strain NJ-15 as a potential biocontrol agent. *Current Microbiol.* **46**: 324-328.
- Banu Doganlar, Z., K. Demir, H. Basak, et I. Gul. 2010. Effects of salt stress on pigment and total soluble protein contents of three tomato cultivars. *Afr. J. Agri. Res.* **05** (15): 2056-2065.
- Barreto, T. R., A.C. M. da Silva, A. C. F. Soares et J. T. de Souza. 2008. Population densities and genetic diversity of actinomycetes associated to the rhizosphere of *Theobroma cacao*. **39**: 464- 470.
- Baskaran, R., R. Vijayakumar et P. M. Mohan. 2011. Enrichment method for the isolation of bioactive actinomycetes from Mangrove sediments of Andaman Islands, India. *Malaysian J. Microbiol.* **07**(1): 26-32.
- Ben Aneur Mehdi, R., S. Sioud, L. Fourati Ben Fguira, S. Bejar, et L. Mellouli. 2006. Purification and structure determination of four bioactive molecules from a newly isolated *Streptomyces* sp. TN.97 strain. *Process Biochem.* **41**: 1506-1513.
- Ben Dkhil, B. et M. Denden. 2010. Salt stress induced changes in germination, sugars, starch and enzyme of carbohydrate metabolism in *Abelmoschus esculents* L. (Moench) seeds. *Afric. J. Agric. Reas.* **05** (12):1412-1418.
- Ben Hassine, A., M. E. Ghanem, S. Bouzid et S. Lutts. 2008. An inland and a coastal population of the Mediterranean xero-halophyte species *Atriplex halimus* L. differ in their ability to accumulate proline and glycine betaine in response to salinity and water stress. **59**: 1315-1326.
- Bendale, M. S., B. L. Chaudhari et S. B. Chinchikar. 2009. Influence of environmental factors on siderophore production by *Streptomyces fulvissimus* ATCC 27431. *Current Trends in Biotechnology and Pharmacy.* **03**(4): 362-371.
- Bilkay, I. S., S. Karakoç et N. Aksöz. 2010. Indole-3-acetic acid production in *Aspergillus niger*. *Turk. J. Biol.* **34**: 313-318.
- Bojovic, B. et J. Stojanovic. 2005. Chlorophyll and carotenoid content in wheat cultivars as a function of mineral nutrition. *Arch. Biol. Sci.* **57** (4): 283-290.
- Boncompagni, E., M. Osteras, M. C. Poggi et D. Le Rudulier. 1999. Occurrence of choline and glycine betaine uptake and metabolism in the family *Rhizobiaceae* and their roles in osmoprotection. *Appl. Environ. Microbiol.* **65** (5): 2072-2077.

- Botia, P., M. Carvajal, A. Cerda et V. Martinez. 1998. Response of eight *Cucumis melo* cultivars to salinity during germination and early vegetative growth. *Agronomie*, **18**: 503-513.
- Bowen, G. D. et A. D. Rovira. 1999. The rhizosphere and its management to improve plant growth. *Adv. Argon.* **66**: pp. 1-102.
- Breckl, S. W. 1995. How do halophytes overcome salinity? *In: Biology of salt-tolerant plants*, Khan, M. I (ed.), Michigan, USA. pp. 119-213.
- Bulter, M. J., P. Bruheim, S. Jovetic, F. Marinelli, P. W. Postma et M. J. Bibb. 2002. Engineering of primary carbon metabolism for improved antibiotic production in *Streptomyces lividans*. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**(10): 4731-4739.
- Cabrera, G., A. Xiong, M. Uebel, V. K. Singh et R. K. Jayaswal. 2001. Molecular characterization of the iron-hydroxamate uptake system in *Staphylococcus aureus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 1001-1003.
- Cai, Y., Q. Xue, Z. Chen et R. Zhang. 2009. Classification and salt-tolerance of actinomycetes in the Qinghai lake water and Lakeside saline soil. *J. Sust. Dev.* **02** (1): 107- 110.
- Carpici, E., B. Clik, B. Necmettin, G. Bayram et B. Asik. 2010. The effects of salt stress on the growth, biochemical parameter and mineral element content of some maize (*Zea mays* L.) cultivars. *Afr. J. Biotech.* **09**: 6937-6942.
- Carvajal, M., F. Del Amor, M., Fernanadez-Ballester, V. Martinez et A. Cerdà, 1998. Time course of salt accumulation and water relations in muskmelon plants exposed to salt during different growth stage. *Plant Sci.* **138**: 103-112.
- Cerdà, A. et V. Martinez, 1988. Nitrogen fertilization under saline conditions in tomato and cucumber plants. *J. Hort. Sci.* **63**: 451-458.
- Cha-Um, S. et C. Kirdmanee. 2009. Effect of salt stress on proline accumulation, photosynthetic ability and growth characters in two maize cultivars. *Pak. J. Bot.* **41**(1): 87-98.
- Cho. S. H., C. W. Hwang, H. K. Chuang et C. S. Yang. 1994. A new medium for the selective isolation of soil actinomycetes. *J. Appl. Microbiol. Biotech.* **22**: 561-563.
- Chung, K. R. et D.Tzeng. 2004. Biosynthesis of indole-3-acetic acid by the gall-inducing fungus *Ustilago esculenta*. *J. Biol. Sci.* **04**(6): 744-750.

- Cohen, G. N. et H. V. Rickenberg. 1956. Concentration spécifique réversible des amino-acides chez *Escherichia coli*. Ann. Inst. Pasteur. **91**: 693-720.
- Cosquer, A., V. Pichereau, J. A. Pocard, J. Minet, M. Cormier et T. Bernard. 1999. Nanomolar levels of dimethylsulfoniopropionate, dimethylsulfonioacetate, and glycine betaine are sufficient to confer osmoprotection to *Escherichia coli*. Appl. Environ. Microbiol. **65**(8): 3304-3311.
- Crawford, D. L., J. M. Lynch, J. M. Whipps et M. A. Ousley. 1993. Isolation and characterization of actinomycete antagonists of a root fungal pathogen. Appl. Environ. Microbiol. **59**: 3899-3905.
- Csonka, L. N. 1989. Physiological and genetic responses of bacteria to osmotic stress. Microbiol. Rev. **53**: 121-147.
- Csonka, L. N. et A. D. Hanson. 1991. Prokaryotic osmoregulation: genetic and physiology. Ann. Rev. Microbiol. **45**: 569-606.
- da Costa, M. S., H.Santos et E. A. Galinski. 1998. An overview of the role and diversity of compatible solutes in bacteria and archaea. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology. **61**: 117-149.
- da Silva Sousa, C., A. C. Fermino Soares et M. da Silva Garrido. 2008. Characterization of streptomycetes with potential to promote plant growth and biocontrol. Sci. Agric. (Piracicaba, Braz.) **65** (1): 50-55.
- Dantas, B. F., L. D. S. Ribeiro et C. A. Aragao. 2005. Physiological response of cowpea seeds to salinity stress. Rev. Bras. Sementes. **27**:144-148.
- Datta, C. et P. S. Basu. 2000. Indole acetic acid production by a *Rhizobium* species from root nodules of a leguminous shrub, *Cajanus cajan*. Microbiol. Res. **155**: 123-127.
- Datta, S. K. 2002. Recent developments in transgenic for abiotic stress in rice. JIRCAS Working Report: 43-53.
- Datta, J. K., S. Nag, A. Banerjef et N. K. Mondal. 2009. Impact of salt stress on five varieties of wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars under laboratory condition. **13** (3): 93-97.
- Davet, P. 1996. Vie microbienne du sol et production végétale. INRA. (eds.), Paris.
- de Boer, W., L. B. Folman, R. C. Summerbell et L. Boddy. 2005. Living in a fungal world: impact of fungi on soil bacterial niche development. FEMS Microbiol. **29**: 795-811.

- Demos, E. K., M. Woolwine, R. H. Wilson et C. McMillan. 1975. The effects of ten phenolic compounds on hypocotyl growth and mitochondrial metabolism of mung bean. *Am. J. Bot.* **62** (1): 97-102.
- Denden, M., T. Benttaieb, A. Salhi et M. Mathlouthi. 2005. Effet de la salinité sur la fluorescence chlorophyllienne, la teneur en proline et la production florale de trois espèces ornementales. *Tropicultura.* **23** (4): 220-225.
- Denizci, A. A. 1996. Study on the detection and production of antibacterial antibiotics from actinomycetes which isolated from the soils of Aegean Eastern black sea regions of Turkey. Ph D. Thesis. Ege University. Institute of Science. Izmir.
- Divya Teja, D., N. Harsha, S. Satya Vishala, P. K et Santhosha Lakshmi. 2014. Production of L-glutaminase from marine ecosystems and optimal conditions for maximal production by actinomycetes. *Int. J. Adv. Res.* **2** (1): 485-491.
- Djerroudi-Zidane, O., M. Belkhodja, S. Bissati et S. Hadjaj. 2010. Effet du stress salin sur l'accumulation de proline chez deux espèces d'*Atriplex halimus* L. et *Atriplex canescens* (Pursh) Nutt. *Eur. J. Sci. Res.* **41** (2) : 249-260.
- Djibaoui, R. et A. Bensoltane, 2005. Effect of iron and growth inhibitors on siderophores production by *Pseudomonas fluorescens*. *Afr. J. Biotechnol.* **04** (7): 697-702.
- Donadio, S., L. Carrano, L. Brandi, S. Serina, A. Soffientiti, E. Raimondi, N. Montanini, M. Sosio et C. O. Gualerzi. 2002. Targets and assays for discovering novel antibacterial agents. *J. Biotech.* **99**: 175-185.
- Driouich, A., M. Ouhssine, A. Ouassou et R. Ben Gaddour. 2001. Effet du NaCl sur l'activité du PEPc foliaire et son rôle sur la synthèse du malate et de la proline chez le blé dur (*Triticum durum* Desf.). *Science Letters.* **03** (3): 20-25.
- El-Jaafari, S. 1993. Contribution à l'étude des mécanismes biophysiques et biochimiques de résistance à la sécheresse chez le blé. Doctorat, Faculté des sciences agronomiques de Gembloux. Belgique, 214 p.
- El-Kaoua., R. Serraj, M. Benichou et D. Hsissou. 2006. Comparative sensitivity of two Moroccan wheat varieties to water stress : the relationship between fatty acids and proline accumulation. *Bot. Studies.* **47**: 51-60.
- El-Nakeeb, M. et H. Lechevalier. 1962. Isolation of aerobic actinomycetes. *Appl. Microbiol.* **11**: 75- 77.

- El-Tarabily, K. A., A. H. Nassar et K. Sivasithamparam. 2008. Promotion of growth of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in a calcareous soil by a phosphate-solubilizing, rhizosphere-competent isolate of *Micromonospora endolithica*. Appl. Soil. Ecol. **39**: 161-171.
- El-Tayeb, M. A. 2006. Differential responses of pigments, lipid per-oxidation, organic solutes, catalase and per-oxydase activity in the leaves of two *Vicia faba* L. cultivars to drought. Int. j. Agri. Biol. **08**(1): 116-122.
- Falk, J. et S. Munné-Bosch. 2010. Tocochromanol functions in plants : antioxydation and beyond. J. Exp. Bot. **61**: 1549-1566.
- Fernandez, C. et R. Novo. 1988. Vida microbiana en el Suelo. Universidad de la Habana.p. 525.
- Finnie, J. F. et J. Van Staden. 1985. Effect of seed weed concentrate and applied hormones on in vitro cultured tomato roots. J. Plant Physiol. **120**: 215-222.
- Flowers, T. J. et A. R. Yeo. 1995. Breeding for salinity resistance in crop plants: where next? Aust. J. Plant Physiol. **22**: 875-884
- Flowers, T. J. et T. D. Colmer. 2008. Salinity tolerance in halophytes. New phytol. **179**: 945-963.
- Foolad, M. R. 1996. Response to selection for salt tolerance during germination in tomato seed derived from PI174263. J. Am. Soc. Hort. Sci. **121**: 1001-1006.
- Gadalla, S. F. 2009. The roles of ascorbic acid and a-tocopherol in minimize of salt-induced wheat flag leaf senescence. J. Agric. Sci. Mansoura Univ. **34** (11): 10645-10661.
- Galinski, E. A. 1995. Osmoadaptation in bacteria. Adv. Microbiol. Physiol. **37** : 273-328.
- Genard, H., J. Le Saos, J. Hillard, A. Tremolieres et J. Boucaud. 1991. Effect of salinity on lipiid composition, glycine betaine content and photosynthetic activity in chloroplasts of *Suaeda maritima*. Plant Physiol. Biochem. **29**: 421-427.
- Ghassemi, F., A. J. Jakeman et H. A. Nix. 1995. Stalinization land and water resources. Human causes, extent management and case studies. Univ. New South Wales, Sydney. p. 256.
- Ghorbani-Nasrbadi, R., R. Greneir, H. A. Alikhani, J. Hamedi et B. Yakhchali. 2013. Distribution of actinomycetes in different soil ecosystems and effect of media

- composition on extracellular phosphatase activity. *J. Plant Sci. Plant Nutr.* **13** (1): 223-236.
- Ghosh, S. et P. S. Basu. 2006. Production and metabolism of indole acetic acid in roots and root nodules of *Phaseolus mungo*. *Microbiol. Res.* **161**: 362-366.
 - Ghoulam, C. et K. Fares. 2001. Effect of salinity on seed germination and early seedling growth of sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Seed Sci. Technol.* **29**: 357-364.
 - Glaasker, E., W. N. Konings et B. Poolman. 1996. Osmotic regulation of intracellular solute pools in *Lactococcus plantarum*. *J. Bacteriol.* **178**: 575-582.
 - Gobinathan, P., B. Sankar, P. V. Murali et R. N. Panneerselvam. 2009. Effect of calcium chloride on salinity –induced oxidative stress in *Pennisetum typoidies*. *Bot. Res. Int.* **02** (3): 143-148.
 - Gouffi, K., T. Bernard et C. Blanco. 2000. Osmoprotection by pipercolic acid in *Sinorhizobium meliloti* : specific effects of D and L isomers. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 2358-2364.
 - Gouffi, K., V. Picherau, J-P. Rolland, D. Thomas, T. Bernard et C. Blanco. 1998. Sucrose is nonaccumulated osmoprotectant in *Sinorhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* **180** (19): 5044-5051.
 - Grieve, C. M. et E. V. Maas. 1984. Betaine accumulation in salt-stressed sorghum. *Physiol. Plant* **61**:167-171.
 - Grieve, C. M. et M. C. Shannon. 1999. Ion accumulation and distribution in shoot components of salt-stressed eucalyptus clones. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* **124**(5): 559-563.
 - Gul, B., M. A. Khan et D. J. Weber. 2000. Alleviation salinity and dark-enforced dormancy in *Allenrolfea occidentalis* seeds under various thermoperiods. *Aus. J. Bot.* **48**: 745-752.
 - Gul, B. et M. A. Khan. 2008. Effect of compatible osmotica and plant growth regulators in alleviating salinity stress on the seed germination of *Allenrolfea occidentalis*. **40**: 1957-1964.
 - Hagedorn, C. 1976. Influences of soil activity on *Streptomyces* population inhabiting forest soils. *Appl. Environ. Microbiol.* **32**: 868- 375.
 - Hamdali, H., B. Bouizgarne, M. Hafdi, A. Lebrihi, M. J. Virolle et Y. Ouhdouch. 2008a. Screening for rock phosphate solubilizing actinomycetes from Moroccan phosphate mines. *Appl. Soil. Ecol.* **38**: 12-19.

- Hamdali, H., M. Hafidi, M. J. Virolle et Y. Ouhdouch. 2008b. Growth promotion and protection against damping-off of wheat by two rock phosphate solubilizing actinomycetes in a P-deficient soil under greenhouse conditions. *Appl. Soil. Ecol.* **40** : 510-517.
- Hamdali, H., A. Smirnov, C. Esnault, Y. Ouhdouch et M. J. Virolle. 2010. Physiological studies and comparative analysis of rock phosphate solubilization abilities of actinomycetes originating from Moroccan phosphate mines and of *Streptomyces lividans*. *Appl. Soil. Ecol.* **44**: 24-31.
- Hamdy, A. 1999. Saline irrigation and management for a sustainable use. *In*: advanced short course on saline irrigation proceeding. Agadir. 152-227.
- Hamza, M. 1967. Influence de diverses concentrations de chlorure de sodium sur la croissance de jeunes plantes de *Triticum sativum* . C. R. Acad. Sci. Paris. 176: 1997-2000.
- Hanson, A. D., B. Rathinasabathi, B. Chamberlin, et D. A. Gage. 1991. Comparative physiological evidence that β -alnine betaine and choline-o-sulfate acts as compatible osmolytes in halophytic *Limonium* species. *Plant Physiol.* **97**: 1199-1205.
- Hartmann, A., S. R. Prabhu et E. A. Galinski. 1991. Osmotolerance of diazotrophic rhizosphere bacteria. *Plant and Soil.* **137**: 105-109.
- Hasegawa, S., A. Meguro, M. Shimizu, T. Nishimura et H. Kunoh. 2006. Endophytic actinomycetes and their interactions with host plants. *Actinomycetol.* **20** (2): 72-81.
- Hayakawa, M. 2008. Studies on the isolation of rare actinomycetes in soil. *Actinomycetol.* **22**: 12- 19.
- Hayakawa, M. et H. Nonomura. 1987. Humic acid – vitamin agar, a new medium for the selective isolation of soil actinomycetes. *J. Ferment. Technol.* **65**:501- 509.
- Hayakawa, M et Nonomura. H. 1989. A new method for the intensive isolation of actinomycetes from soil. *Actinomycetol.* **03**: 95- 104.
- He, F., Y. Yang, G. Yang et L. Yu. 2010. Studies on antibacterial activity and antibacterial mechanism of a novel polysaccharide from *Streptomyces virginia* H03. *Food Control.* **21**: 1257-1262.
- Higashide, E. 1995. Screening of new antibiotics produced by actinomycetes and their production. *Actinomycetol.* **09** (1): 75-82.

- Hoorman, J. J. et R. Islam. 2010. Understanding soil microbes and nutrient recycling. FACT SHEET. Agriculture and Natural Resources. The Ohio State University, pp.1-5.
- Hoster, F., J. E. Schmitz et R. Daniel. 2005. Enrichment of chitinolytic microorganisms: isolation and characterization of chitinases exhibiting antifungal activity against phytopathogenic fungi from a novel *Streptomyces* strain. Appl. Microbiol. Biotech. **66**: 434-442.
- Hua, S-S.T., V. Y. Tsai, G. M. Lichens et A. T. Noma. 1982. Accumulation of amino acids in *Rhizobium* sp. strain WR 1001 in response to sodium chloride salinity. Appl. Environ. Microbiol. **44**: 135-140.
- Hussein, K., M. Hussein, K. Nawaz, A. Majeed et K. H. Bhatti. 2011. Morphological response of chaksu (*Cassia absus* L.) to different concentrations of indole acetic acid (IAA). **43** (3): 1491-1493.
- Igarashi, I. 2004. Screening of novel bioactive compounds from plant-associated actinomycetes. Actinomycetol. **18** (2): 63-66.
- Imhoff, J. F. et F. Rodriguez-Valera. 1984. Betaine is the main compatible solute of halophilic eubacteria. J. Bacteriol. **160** (1): 478-479.
- Iqbal, N., M. Y. Ashraf, F. Javed, V. Martinez et K. Ahmad. 2006. Nitrate reduction and nutrient accumulation in wheat (*Triticum aestivum* L.) grown in soil salinisation with four different salts. J. Plant Nutrition. **29**: 409-421.
- Ishiyama, D., D. Vujaklija et J. Davies. 2004. Novel pathway of salicylate degradation by *Streptomyces* sp. strain WA46. Appl. Environ. Microbiol. **70** (3): 1297-1306.
- Iturriaga, G., R. Suárez, et B. Nova-Franco. 2009. Trehalose metabolism: from osmoprotection to signaling. Int. J. Mol. Sci. **10**: 3793-3810.
- Jaleel, C. A., P. Manivannan et G. M. A. Lakshmanan. 2007. NaCl as a physiological modulator of proline metabolism and antioxidation *Phyllanthus amarus*. C. R Biologies. **330**: 806-813.
- Jamil, M. et E. S. Rha. 2004. The effect of salinity (NaCl) on the germination and seedling of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) and Cabbage (*Brassica oleracea capitata* L.), Korean J. Plant Res. **07**: 226-232.

- Jamil, M., D. B. Lee, K. Y. Jung, M. Ashraf, S. C. Lee et E. S. Rha. 2006. Effect of salt (NaCl) stress on germination and early seedling growth of four vegetables species. *Central Eur. Agric.* **07**(2): 273-282.
- Jarak, M., R. Protic, S. Jankovic, et J. Colo. 2006. Response of wheat to *Azotobacter*-actinomycetes inoculation and nitrogen fertilizers. *Romanian Agric. Res.* **23**:37-41.
- Jiang, C. L. et Xu, L. H. 1990. Characteristics of the populations of soil actinomycetes in Yunnan. *Actinomycetes.* **01**: 67- 74.
- Jiang, Y., W. J. Li, P. Xu, S. K. Tang et L. H. Xu. 2005. Study on diversity of actinomycetes salt and alkaline environments. *Wei Sheng Wu Xue Bae.* **46**: 191-195.
- Jignasha, T. T. et S. P. Singh. 2007. Secretion of an alkaline protease from a salt-tolerant and alkaliphilic, *Streptomyces clavuligerus* strain Mit-1. *Braz. J. Microbiol.*, **38**: 766-772.
- Jithesh, M. N., S. R. Prashanth, K. R. Sivaprakash et A. K. Parida. 2006. Antioxydative response mechanisms in halophytes: their role in stress defense. *Ind. Acad. Sci.* **85**(3): 237-254.
- Johnson, L. E. et A. Dietz. 1968. Kalafungin, a new antibiotic produced by *Streptomyces tanashiensis* strain Kala. *Appl. Microbiol.* **16**(12): 1815-1821.
- Keiffer, C. H. et I. A. Ungar. 1997. The effect of extend exposure to hyper saline conditions on the germination of five inland halophytes species. *Am. J. Bot.* **84**: 104-111.
- Kennedy, A. C. 1999. Bacterial diversity in agrosystems. *Agr. Ecosyst. Environ.* **74**: 65- 76.
- Kets, E. P.W., M. N. Groot, E. A. Galinski, et de Bont, J. A. M. 1997. Choline and acetylcholine: novel cationic osmolytes in *Lactococcus plantarum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **48** : 94-98.
- Keyeo, F., O. Noor Ai'shah, et H. G. Amir. 2011. The effects of nitrogen fixation activity and phytohormones production of diazotroph in promoting growth of rice seedlings. *Biotech.* **10**: 1-7.
- Khamna, S., A. Yokota, J. F. Peberdy et S. Lumyong. 2010. Indole-3-acetic acid production by *Streptomyces* sp. isolated from some Thai medicinal plant rhizosphere soils. *Eurasian J. Biosciences.* **04**: 23-32.

- Khan, M. A. et S. Gulzar. 2003. Germination responses of *Sporobolus ioclados* : a saline desert grass. *J. Arid Environ.* **53**: 387-394.
- Khan, M. A., I. A. Ungar et A. M. Showalters. 2000. Effects of salinity on growth, water relations and ion accumulation of the subtropical perennial halophyte, *Atriplex griffithii* var. *stocksii*. *Annals of Botany.* **85**: 225-232.
- Khan, M. A., M. U. Shirazi, M. Dali Khan, S. M. Mujtaba, E. Islam, S. Mumtaz, A. Shereen, R. U. Ansari et M. Yasin Ashraf, 2009. Role of proline, K^+/Na^+ ratio and chlorophyll content in salt tolerance of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Pak. J. Bot.* **41** (2): 633-638.
- Kiene, R. P. 1998. Uptake of choline and its conversion to glycine betaine by bacteria in estuarine waters. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**(3): 1045-1051.
- Killham, K. et M. K. Firestone. (1984a). Salt stress control of intracellular solutes in streptomycetes indigenous to saline soils. *Appl. Environ. Microbiol.* **47**: 301-306.
- Killham, K. et M. K. Firestone. (1984b). Proline transport increases growth efficiency in salt-stressed *Streptomyces griseus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **48**(1): 239-241.
- Ko, R., T. L. Smith et G. M. Smith. 1994. Glycine bétaine confers enhanced osmotolerance and cryotolerance on *Listeria monocytogenes* J. *Bacteriol.* **176**(2): 426-431.
- Kumar, C. S., A. Singh, P. K. Sagar et J. N. Maurya. 2011. Effect of indole acetic acid on wheat (*Triticum aestivum* L.) irrigated with sewage water. *J. Physiol.* **03** (8):08-11.
- Kushner, D. J., F. Hamaide, et R. A. MacLeod. 1983. Development of salt-resistant active transport in a moderately halophilic bacterium. *J. Bacteriol.* **153**(3): 1163-1171.
- Kushner, D.J. 1978. Life in high and solute concentrations: halophilic bacteria. *In: Microbial life in extreme environments*, Kushner, D.J (ed), Academic Press, Ltd, London, pp. 317-368.
- Küster E. 1959. Outline of a comparative study of criteria used in characterization of the actinomycetes. *Bull. Bact.Nomen. and Taxon.* **09**: 98-104.
- Küster E. et S. T. Williams. 1964. Selection of media for isolation of streptomycetes. *Nature, London.* **202**: 928.

- Küster, E.1968. The actinomycetes. *In: soil biology.* (Eds), Burges, A.et F. Raw, Academic press, London, pp. 111- 124.
- Lakshmiathy, D et K. Kannabiran. 2009. A morphological, biochemical and biological studies of halophilic *Streptomyces* sp. Isolated from Saltpan environment. *Amer. J. Infect. Dis.* **05** (3): 200- 206.
- Lamosa, P., L. O.Martins, M. S. da Costa et H. Santos. 1998. Effects of temperature, salinity, and medium composition on compatible solute accumulation by *Thermococcus* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* **64** (10): 3591-3598.
- Landfald, B. et A. R. Srtøm. 1986. Choline-glycine bétaine pathway confers a high level of osmotic tolerance in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **165**(3): 849-855.
- Le Houérou, H. N. 1993. Salt tolerant plants for the arid regions of the Mediterranean isoclimatic zone, *In: Towards the rational use of the high salinity tolerant plants.* H. Lieth and A. Al-Masoom (eds.) , Vol. 1.1. Kluwer, Publishers, Netherlands, pp. 403-422.
- Le Rudulier, D et L. Bouillard. 1983. Glycine betaine, an osmotic effector in *Klebsiella pneumoniae* and other members of the *Enterobacteriaceae*. *Appl. Environ. Microbiol.* **46** : 152-159.
- Le Rudulier, D. 1993. Elucidation of the role of osmoprotective compounds and osmoregulatory genes: the key role of bacteria, p. 313-322. *In.* H. Lieth and A. Al Masoom (eds), *Towards the rational use of high salinity tolerant plants*, Vol. 1. Kluwer Academic publishers, Netherlands.
- Lechevalier , M. P et H. A. Lechevalier. 1967. Biology of actinomycetes. *Annu. Rev. Microbiol.* 21: 71-100.
- Lechevalier , M. P. et Lechevalier. H. A. 1970. Chemical composition as a criterion in the classification of aerobic actinomycetes. *Inter. J. Sys. Bacteriol.* 20 (4): 435-443.
- Lechevalier , M. P. et H. A. Lechevalier. 1980. The Chemotaxonomy of actinomycetes *In : Microbiology Thayer Actinomycete taxonomy* Eds : A. Dietz, D. W. Society for industrial SIM, Special publication Number, 6. Arlington, Virginia, USA, pp. 225- 291.
- Leidi, E. O., R. Nogales et S. H. Lips. 1991. Effect of salinity on cotton plants grown under nitrate or ammonium nutrition at different calcium levels. *Fields Crops Research.* **26**: 35-44.

- Lemriss, S., F. Laurent, A. Couble, E. Casoli, J. M. Lancelin et D. Saintpierr-Bonaccio. 2003. Screening of nonpolyenic antifungal metabolites produced by clinical isolates of actinomycetes. *Can. J. Microbiol.* **49**: 669-674.
- Liangpeng, Y., M. Jian et L. Yan. 2007. Soil salt and nutrient concentration in the rhizosphere of desert halophytes. *Acta Ecologica Sinica.* **27** (9): 3565-3571.
- Llic, S. B., S. S. Konstantinovic, Z. B. Todorovic, M. L. Lazic, V. B. Veljkovic, N. Jokovic, et B. C. Radovanovic. 2007. Characterization and antimicrobial activity of the bioactive metabolites in streptomycetes isolates. *Microbiol.* **76**:421-428
- Lloyd, J., P. E. Kriedmann et D. Aspinall. 1989. Comparative sensitivity of ‘Prior Lisbon’ lemon and ‘Valensa’ orange trees to foliar sodium and chloride concentrations. *Plant Cell Environ.* **12**: 529-540.
- Locci, R. 1989. *Streptomyces* and related genera. *In: Bergey’s manual of Systematic Bacteriology*, William, S. T. and J. G. Hot (Eds.). Williams and Wilkins, Baltimore, pp: 2451- 2491.
- Loggini, B., A. Scartazza, E Brugnoli et F. Navari-Izzo. 1999. Antioxydative defense system, pigment composition and photosynthetic efficiency in two wheat cultivars subjected to drought. *Plant. Physiol.* **119**: 1091-1099.
- Loper, J. E. et M. N. Schroth. 1986. Influence of bacterial source of indole-3-acetic acid of root elongation on sugar beet. *Phytopathol.* **76**: 386-389.
- Lucht, J. M. et E. Bremer. 1994. Adaptation of *Escherichia coli* to high osmolarity environments : osmoregulation of the high affinity glycine betaine transport system *Pro U. FEMS Microbiol. Rev.* **14**: 3-20.
- Maas, E. V. 1986. Salt tolerance of plants. *Appl. Agri. Res.* **01**: 12-26.
- Macagnan, D., R. da S. Romeiro, A. W.V Pomella et T. de Souza. 2008. Production of lytic enzymes and siderophores, and inhibition of germination of basidiospores of *Moniliophthora (ex Crinipellis) pernicioso* by phylloplane actinomycetes. *Biol. Control.* **47**: 309-314.
- Maghsoudi, A. M. et K. Maghsoudi, 2008. Salt stress effects on respiration and growth of germinated seeds of different wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars. *W. J. Agric. Sc.* **04** (3): 351-358.
- Maier, R. M., I. L. Pepper et C. P. Gerba. 2000. Microorganisms in surface soils. *In: Environmental microbiology*. Academic press. A Harcourt Science and technology company. Canada, , pp. 79-82

- Mäkelä, P. P. Peltonen-Sainio, K. Jokinen, E. Pehu, H. Setälä, R. Hinkkanen et S. Somersalo. 1996. Uptake and Translocation of foliar-applied glycine betaine in crop plants. *Plant Sci.* **121**: 221-230.
- Malin, G. et A. Lapidot. 1996. Induction of synthesis of tetrahydropyrimidine derivatives in *Streptomyces* strains and their effect on *Escherichia coli* in response to osmotic and heat stress. *J. Bacteriol.* **178**: 385-395.
- Mandhania, S., S. Madan et S. Sheokand. 2010. Differential response in salt tolerant and sensitive genotypes of wheat in terms of ascorbate, carotenoids proline and plant water relations. *Asian J. Exp. Sci.* **01(4)**: 792-797.
- Mateo, A., P. Muhlenbock, C. Rusterucci, C. Chang, Z. Miszalski, B. Karpinska, J. E. Parker, P. M. Mullineaux, S. Karpinski, 2004. Lesion stimulating disease 1 is required for acclimation to conditions that promote excess excitation energy. *Plant Physiol.* **136**: 2818-2830.
- Matoh, T., J. Watanabe et E. Takahashi. 1987. Sodium, potassium, chloride, and betaine concentrations in isolated vacuoles from salt-grown *Atriplex gmelini* leaves. *Plant Physiol.* **84**: 173-177.
- Matsukawa, E., Y. Nakagawa, Y. Limura et M. Hayakawa. 2007. Stimulatory effect of indole-3-acetic acid on aerial mycelium formation and antibiotic production in *Streptomyces* spp. *Actinomycetol.* **21**: 32-39.
- May, G., E. Faatz, M. Villagero et E. Bremer. 1986. Binding protein dependant transport of glycine betaine and its osmotic regulation in *Escherichia coli* K 12. *Mol. Gen. Genet.* **205**: 225-233.
- McBride, M. J et J. C. Ensign. 1987. Effects of intracellular trehalose content on *Streptomyces griseus* spores. *J. Bacteriol.* **169**: 4995-5001.
- McDonnell, E. et R. G. Wyn Jones. 1988. Glycine betaine biosynthesis and accumulation in unstressed and salt-stressed wheat. *J. Exp. Bot.* **39**: 421-430.
- Miller, E. N. et L. O. Ingram. 2007. Combined effect of betaine and trehalose on osmotic tolerance of *Escherichia coli* in mineral salts medium. *Biotechnol. Lett.* **29**: 213-217.
- Miller, K. J et J. M. Wood. 1996. Osmoadaptation by rhizosphere bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **50**: 101-136.

- Mitsuiki, S., M. Sakai, Y. Moriyama, M. Goto et K. Furukawa. 2002. Purification and some properties of keratinolytic enzyme from an alkaliphilic *Nocardioopsis* sp. TOA-1. *Biosci. Biotech. Biochem.* **66**: 164- 167.
- Moleenar, D., A. Hagting, H. Alkema, A. J. M. Driessen et W. N. Konings. 1993. Characteristics and osmoregulatory roles of uptake systems for proline and glycine betaine in *Lactococcus lactis*. *J. Bacteriol.* **175**: 5438-5444.
- Moradi, A., A. Tahmourespour, M. Hoodaji et F. Khorsandi. 2011. Effect of salinity on free living-diazotroph and total bacterial populations of two saline soils. *Afr. J. Microbiol. Res.* **05**(2): 144-148.
- Muller, G., B. F. Matzanke et K. N. Reymond. 1984. Iron transport in *Streptomyces pilosus* mediated by ferrichrome siderophores, rhodotorulic acid, and enantion-rhodotorulic acid. *J. Bacteriol.* **160**: 313-318.
- Muller, M., C. Deigele et H. Ziegler. 1989. Hormonal interactions in the rhizospheres of maize (*Zea mays* L.) and their effect on plant development. *Z Pflanzenernahr. Bodenkd.* **152**: 247-254.
- Munns, R. 2002. Comparative physiology of salt and water stress. *Plan Cell Environ.* **25**: 239-250.
- Narayana, K. J. P., P. Prabhakar, M. Vijayalakshmi.P.,Y. Venketeswarlu et P. S. J. Krishna. 2007. Biological activity of phenylpropionic acid from a terrestrial *Streptomyces*. *Polish. J. Microbiol.* **56**: 191-197.
- Narayana, K. J. P., P. Prabhakar, P. S. J. Krishna, Y. Venketeswarlu et M. Vijayalakshmi. 2009. Indole-3-acetic acid production by *Streptomyces albidoflavus*. *J. Biol. Res.-Thessaloniki.* **11**: 49-55.
- Nelson, D. R. et P. M. Mele. 2007. Subtle changes in rhizosphere microbial community structure in response to increased boron and sodium chloride concentrations. *Soil. Biol. Biochem.* **39**: 340-351.
- Ng. Y.K., M. P. Hodson, A.K. Hewavitharana, U. Bose, P. N. Shaw et J. A. Fuerst. 2014. Effect of salinity on antibiotic production in sponge-derived *Salinispora* actinobacteria. *J. Appl. Microbiol.*
- Nonomura, H. 1988. Isolation, taxonomy and ecology of soil actinomycetes. *Actinomycetol.* **03**: 45- 54.

- Norovsuren, Z., G. V. Oborotov, G. M. Zenova, R. A. Aliev et D. G. Znyagintsev. 2007. Haloalkaliphilic actinomycetes in soils of Mongolian desert steppes. *Biol. Bull.* **34** (4): 417-422.
- Nytyossölä, A., T. Reinikainen et M. Leisola. 2001. Characterization of glycine sarcosine N-methyltransferase and sarcosine dimethylglycine N-methyltransferase. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**(5): 2044-2050.
- Omar, S. A., M. A. Abdel-Sater et M. H. Abd-Alla. 1994. Growth and enzyme activities of fungi and bacteria in soil salinized with sodium chloride. *Folia Microbiologica.* **39**: 23-28.
- Onaka, H. 2006. Biosynthesis of heterocyclic antibiotics in actinomycetes and an approach to synthesize the natural compounds. *Actinomycetol.* **20**(2): 62-71.
- Ottow, J. C. G. et H. Glathe. 1968. Rose Bengal- malt extract- agar, a simple medium for the simultaneous isolation and enumeration of fungi and actinomycetes from soil. *Appl. Microbiol.* **16** (1): 170-171.
- Ouiza, D-Z., M. Belkhodja, S. Bissati et S. Hadjadj. 2010. Effet du stress salin sur l'accumulation de proline chez deux espèces d'*Atriplex halimus* L. et *Atriplex canescens* (Pursh) Nutt. *Euro. J. Sic. Res.* **41** : 249-260.
- Pansu, M., J. Gautheyrou et J. Y. Loyer. 1993. L'analyse du sol : échantillonnage, instrumentation et contrôle, p. 925. Masson (ed.) Paris.
- Pedranzani, H., G. Racogni, S. Alemanon, O. Miersch, I. Ramirez, H. Pena-Cortes, E. Taleisnik, E. Machoda-Domenech, et G. Abdala. 2003. Salt tolerant tomato plants show increased levels of jasmonic acid. *Plant Growth Regul.* **41**: 149-158.
- Pérez-Miranda, S., N. Cabirol, L. George-Téllez, L. S. Zamudio-Rivera et E. J. Fernández. 2007. O-CAS, a fast and universal method for siderophore detection. *J. Microbiol. Methods.* **70**: 127-131.
- Perrig, D., M. L. Boiero, O. A. Masciarelli, C. Penna, O. Ruiz, F. D. Cassan et M. V. Luna. 2007. Plant-growth-promoting compounds produced by two agronomically important strains of *Azospirillum brasilense*, and implications for inoculant formulation. *Appl. Microbiol. Biotech.* **75** (5): 1143-1150.
- Perroud, B et D. Le Rudulier. 1985. Glycine betaine transport in *Escherichia coli*: osmotic modulation. *J. Bacteriol.* **161**: 393-401.

- Petrosyan, P., M. Garcia-Varela, A. Luz-Madrigal, C. Huitron et M. E. Flores. 2003. *Streptomyces mexicannus* sp. Nov., a xylanolytic microorganism isolated from soil. *Inter. J. Sys. Microbiol.* **53**: 269-273.
- Pettey, T. M. et D. L. Crawford. 1984. Enhancement of lignin degradation in *Streptomyces* spp. By protoplast fusion. *Appl. Environ. Microbiol.* **47**(2): 439-440.
- Pinet, J. M. et A. L. Demain. 1988. Actinomycetes in biotechnology. An overview. *In: Goodfellow, M., S. T. Williams and M. Mordarski (eds.). London, Academic Press, pp. 461-482.*
- Pisano, M., M. J. Sommer et M. M. Lopez. 1986. Application of pretreatment for the isolation of bioactive actinomycetes from marine sediments. *Appl. Microbiol. Biotech.* **25**: 285- 288.
- Poljakoff-Mayber, A., G. F. Somers, E. Werker et J. L. Gallagher. 1994. Seeds of *Kosteletzkya virginica* (Malvaceae): their structure, germination and salt tolerance. II. Germination and salt tolerance. *Am. J. Bot.* **81**: 54-59.
- Polonenko, D. R., C. I. Mayfield et E. B. Dumbroff. 1986. Microbial responses to salt-induced osmotic stress. Effects of salinity on growth and displacement of soil bacteria. *Plant Soil.* **92**: 417-425.
- Pometto, A. L. et D. L. Crawford. 1985. L-phenylalanine and l-tyrosine catabolisme by selected *Streptomyces* species. *Appl. Environ. Microbiol.* **49**(3): 727-729.
- Pometto, A. L., B. Lee et K. E. Johnson. 1992. Production of an extracellular polyethylene-degrading enzyme(s) by *Streptomyces* species. *Appl. Environ. Microbiol.* **58** (2): 731-733.
- Porter, J. N., J. J. Wilhelm et H. D. Tresner. 1960. Method for the preferential isolation of actinomycetes from soil. *Appl. Microbiol.* **08**: 174.
- Prado, F. E., C. Boero, M. Gallardo et J. A. Gonzalez. 2000. Effect of NaCl on germination, growth and soluble sugars. *Bot. Bull. Acad. Sin.* **41**:27-34.
- Pridham, T. G., L. A. Lindenfelser, O. L. Shotwell, F. H. Stodola, R. G. Benedict et R. W. Jackson. 1956. Antibiotics against plant disease. II. Effective agents produced by *Streptomyces cinnamoneus* of *Azacoluta* f. nov. *phytopath.* **46**: 757-581.

- Pridham, T. G., P. Anderson, C. Foley, L. A. Linden Felser, C. W. Hesseltine et R. G. Benedict. 1957. A selection of media for maintenance and taxonomy study of streptomycetes. *Antibiotics. Ann.* 974-953.
- Pridham, T. G. et A. J. Lyons. 1961. *Streptomyces albus* (ROSSI DORIA) WAKSMAN and HENRICI : taxonomic study of strains labeled *Streptomyces albus*. *J. Bacteriol.* 81: 431-441.
- Pridham, T. G. Colour and streptomycetes. 1965. Report of an international workshop on determination of colour of streptomycetes. *Appl. Microbiol.* 13: 43-61.
- Qiu, N., Q. Lu et C. Lu, 2003. Photosynthesis, photosystem II efficiency and the xanthophylls cycle in the salt adapted halophyte *Atriplex centralasatica*. *New phytologist.* **159** (2): 479-486.
- Ragab, 1993. Distribution pattern of soil microbial population in salt-affected soils, *In: H. Lieth and A. Al-Masoom (eds). Towards the rational use of high salinity tolerant plants. Vol. 1. Kluwer Academic Publishers, Netherlands. pp. 467-472.*
- Ray, S. D., K. N. Guruprasad et M. M. Laloraya. 1980. Antagonistic effect of phenolic compounds on abscisic acid-induced inhibition of hypocotyl growth. *J. Exp. Bot.* **31** (6): 1651-1656.
- Ray, S. D. et M. M. Laloraya. 1984. Interaction of gibberellic acide, abscisic acid, and phenolic compounds in the control of hypocotyls growth of *Amaranthus caudatus* seedlings. *Revue canadienne de botanique.* **62** (10): 2047-2052.
- Rekoslavskayal, N. I., O. V. Yurjeval, R. K. Salyaev, S. Mapelli et T. V. Kopytinal. 1999. D-tryptophan as IAA source during wheat germination. *Plant Physiol.* **25**: 39-49.
- Rhodes, D et A. D. Hanson. 1993. Quaternary ammonium and tertiary sulfonium compounds in higher plants. *Annu. Plant Physiol. Plant. Mol. Biol.* **44**: 357-384.
- Riedlinger, J., S. D. Schrey, M. T. Tarkka, R. Hampp, M. Kapur et H.P. Fiedler. 2006. Auxofuran, a novel metabolite that stimulates the growth of fly agaric, is produced by the mycorrhiza helper bacterium *Streptomyces* Strain AcH 505. *Appl. Environ. Microbiol.* **72** (5): 3550-3557.
- Ruffino, A. M. C., M. Rosa, M. Hilal, J. A. González et F. E. Prado. 2010. The role of cotyledon metabolism in the establishment of quinoa (*Chenopodium quinoa*) seedlings growing under salinity. *Plant Soil.* **326**: 213-224.

- Rugthaworn, P., U. Dillokkunanant, S. Sangchote, N. Piadang et V. Kitpreechavanich. 2007. A search and improvement of actinomycetes strains for biological control of plant pathogens. *Kasetsart J. (Nat. Sci.)*. **41**: 248-254.
- Saadoun L. et F. Al Moumani. 1997. Streptomycetes from Jordan soils active against *Agrobacterium tumefaciens*. *Actino. B (1 et 2)*: 29- 36.
- Saboury, A. A. et F.Karbassi, 2000. Thermodynamic studies on the interaction of calcium ion with alpha-amylase-thermochemical. *Actinomycetol.* **362**: 121-129.
- Sachdev, D. P., H. G. Ghaudhari, V. M. Kasture, D. D. Dhavale et B. A. Chopade. 2009. Isolation and characterization of indole acetic acid (IAA) producing rhizobacteria strains from rhizosphere of wheat (*Triticum aestivum*) and their effect on plant growth. *Indian J. Exp. Biol.* **47**: 993-1000.
- Sahasrabudhe, M. M. 2011. Screening of rhizobia for indole acetic acid production. *Anal. Biol. Res.* **02**:460-468.
- Sahu, M. K., K. Sivakumar, T. Thangaradjou et L. Kannan. 2007. Phosphate solubilizing actinomycetes in the estuarine environment: An inventory. *J. Environ. Biol.* **28**(4): 795-798.
- Samson, D. S., M. Irimia, C. Bocanu, I. M. Popa et N. A. Elenei. 2006. Effet des polymères acryliques sur la microflore du sol. *Sci. Study Res.* **2**: 463-468.
- Saum, S. H. V. et Müller. 2007. Salinity-dependant switching of osmolyte strategies in a moderately halophilic bacterium: Glutamate induces proline biosynthesis in *Halobacillus halophilus*. *J. Bacteriol.* **189** (19): 6968-6975.
- Schobert, B. 1977. Is there an osmotic regulatory mechanism in algae and higher plants? *J. Thero. Biol.* **68**: 17-26.
- Schwartz, D., S. Berger, E. Heinzemann, K. Mudchko, K. Xelzel, et W. Wohlleben. 2004. Biosynthetic gene cluster of the herbicide phosphinothricin tripeptide from *Streptomyces viridochromogenes* TŪ494. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**(12): 7093-7102.
- Shafi, M., J. Bakht, M. Javed, Khan, M. Aman Khan et A. Raziuddin,. 2011. Role of abscisic acid and proline in salinity tolerance of wheat genotypes. *Pak. J. Bot.* **43** (2): 1111-1118.
- Shahba, Z., Baghizadeh, A. et M. Yousfi. 2010. The salicylic acid effect on the tomato (*Lycopersicum esculentum* Mill.) germination, growth and photosynthetic pigment under salinity stress. *J. Stress Physiol. Biochem.* **06** (03): 05-16.

- Sharma, S., S. S. Sharma et V. K. Rai. 1986. Reversal of phenolic compounds of abscisic acid-induced inhibition of in vitro activity of amylase from seed of *Triticum aestivum* L. *New Phytol.* **103** (2): 293-297.
- Sheng, Q., L.Jie, C. Hua-Hong, Z. Guo-Zhen, Z. Wen-Yong, J. Cheng-Lin, X. Li-Hua et I. Wen-Jun. 2013. Isolation, diversity and antimicrobial activity of rare actinobacteria from medicinal plants of tropical rain forests in Xishuangbanna, China. *Appl. Environ. Microbiol.* **75** (19): 6176-6186.
- Shirling, E. B. et D. Gottlieb. 1966. Methods for characterization of *Streptomyces* species. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **16** (3):313- 340.
- Shirokikh, I. G., G. M. Zenova, O. V. Merzaeva, E. V. Lapygina, G. A. Batalova, et L. V. Lysak . 2007. Actinomycetes in prokaryotic complex of the rhizosphere of oats in a soddy-podzolic soil. *Eurasian soil Sci.* **40**: 158-162.
- Shrivastava, S., S. F. D'Souza et P. D. Desai. 2008. Production of indole-3-acetic acid by immobilized actinomycete (*Kitasatospora* sp.) for soil applications. *Current Sci.* **94** (25): 1595-1604.
- Singh, L.R., T.A. Dar, S. Rahman, S. Jamal, et F. Ahmad., 2009. Glycine betaine may have an opposite effects on protein stability at high and low pH values. *Biochimica et Biophysica Acta.* **1794**: 929-935.
- Singleton, P. W., S. A. Swaify et B. B. Bohlool. 1982. Effect of salinity on *Rhizobium* growth and survival. *Appl. Environ. Microbiol.* **44** (4): 884-890.
- Sobhanian, H., K. Aghaei et S. Komatsu. 2011. Changes in the plant proteome resulting from salt stress: toward the creation of salt tolerant crops? *J. Proteomics.* **74**(8): 1323-1337.
- Sommer, P., C. Bormann et F. Cötzt. 1997. Genetic and biochemical characterization of a new extracellular lipase from *Streptomyces cinnamomeus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**(9): 3553-3560.
- Sridevi, M. et K. V. Mallaiah. 2008. Production of indole-3-acetic acid by *Rhizobium* isolates from *Sebania* species. *Plant. Sci. Res.* **01** (1): 13-16.
- Sridevi, M., K. G. Kumar et K. V. Mallaiah. 2008. Production of catechol-type of siderophores by *Rhizobium* sp. isolated from stem nodules of *Sesbania procumbens* (Roxb.) W and A. *Res. J. Microbiol.* **03**(4): 282-287.
- Stein, A., J. A. Fortin et G. Vallee. 1990. Enhanced rooting of *Picea mariana* cuttings by ectomycorrhizal fungi. *Can. J. Bot.* **68**: 492-498.

- Stevenson, I. I. 1956. Antibiotic activity of actinomycetes in soil and their controlling effects on root-rot of wheat. *J. Gen. Microbiol.* **14**: 440-448.
- Steward, C. R. 1981. Proline accumulation : biochemical aspects. *In* : L. G. Paleg and D. Aspinall (eds). *The physiology and biochemistry of drought resistance in plants*. Academic Press, Adelaide.
- Strzelczyk, E., J. W. Rouatt et E. A. Peterson. 1968. Studies on actinomycetes from soils of Baffin Island. *Contribution.* **37**: 130-139.
- Subrabani, R. et W. Aalbersberg. 2012. Marine actinomycetes : an ongoing source of novel bioactive metabolites. *Microbiol. Res.* **167** (10): 571-580.
- Sutherland, J., D. L. Crawford et A. L. Pometto. 1981. Catabolisme of substituted benzoic acids by *Streptomyces* species. *Appl. Environ. Microbiol.* **41**(2): 442-448.
- Suzuki, K. I. 1993. Search and discovery of soil microorganisms which produce new bioactive substances: selective isolation of microorganisms and their fermentation products. *Actinomycetol.* **07**: 107-109.
- Suzuki, S. I., T. Okuda et S. Komatsubara. 2001. Selective isolation and study on global distribution of the genus *Planobispora* in soil. *Can. J. Microbiol.* **47** (11): 979- 986.
- Szabo, I., A. Benedek, et G. Barabas. 1985. Possible role of streptomycin released from spore cell wall of *Streptomyces griseus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **50**(2): 438-440.
- Szeszak, F. et Szabo, G. 1967. Antibiotic production of hyphal fractions of *Streptomyces griseus*. *Appl. Microbiol.* **15**(5): 1010-1013.
- Taffouo, V. D., N. L. Djiotie, M. kenné, N. Din, J. R. Priso, S. Dibong et A. Akoa. 2008. Effects of salt stress on physiological and agronomic characteristics of three tropical cucurbit species. *J. Appl. Biosci.* **10**: 434-441.
- Thumar, J. T. et S. P. Singh. 2007. Secretion of an alkaline protease from a salt-tolerant and alkaliphilic *Streptomyces clavuligerus* Strain MIT-1. *Braz. J. Microbiol.* **38**: 766-772.
- Tokala, R. K., J. I. Strap, C. M. Jung, D. L. Crawford, M. H. S. Love, L. A. Deoblad, J. F. Bailey et M. J. Morra. 2002. Novel plant-microbe rhizosphere interaction involving *Streptomyces lydicus* WYEC108 and the pea plant (*Pisum sativum*). *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 2161-2171.

- Tounekti, T., A. M. Vadel, M. Onate, M. Khemira. Et S. Munné-Bosch. 2011. Salt induced oxydative stress in rosemary plants: damage or protection? *Environ. Exp. Bot.* **71** : 298-305.
- Touraine, B., Ammar, M. 1985. Etude comparée de la sensibilité au sel d'un triticales et d'une orge. *Agronomie.* **05**: 391-395.
- Trotsenko, Y. A. et V. N. Khmelenina. 2002. Biology of extremophilic and extremotolerant methanotrophs. *Arch. Microbiol.* **177**: 123-131.
- Tunçtürk, M., R. Tunçtürk, B. Yildirim et V. Çiftçi. 2011. Effect of salinity stress on plant fresh weight and nutrient composition of some canola (*Brassica napus* L.) cultivars. *Afr. J. Biotech.* **10** (10):1827-1832.
- Vendruscolo, A. C. G., I. Schuster, M. Pillegi, C. A. Scapim, H. B. C. Molinari, C. J. Marur et L. G. C. Vieira. 2007. Stress-induced synthesis of proline confers tolerance to water deficit in transgenic wheat. *J. Plant. Physiol.* **164** (10): 1367-1370.
- Vijayakumar, R., C. Muthukumar, N. Thajuddin, A. Panneerselvam et R. Saravanamutn. 2007. Studies in the diversity of actinomycetes in Palk Strait region of Bay of Bengal, India. *Actinomycetol.* **21**: 59- 65.
- Vimal, V., B. M. Rajan et K. Kannabira. 2009. Antimicrobial activity of marine actinomycete, *Nocardiopsis* sp. VITSVK 5 (FJ973467). *Asian J. Med. Sci.* **01**: 57-63.
- Vitousek, P. M. et R. W. Howarth. 1991. Nitrogen limitation on land and in the sea: How can it occur? *Biogeochem.* **13**: 87-115.
- von Weymarn, N., A. Nyssölä, T. Reinikainen, M. Leisola et H. Ojamo, 2001. Improved osmotolerance of recombinant *Escherichia coli* by de novo glycine bétaine biosynthesis. *Appl. Microbiol. Biotech.* **55** (2): 214-218.
- Whitehead, D. C., H. Dibb et R. D. Hartley. 1982. Phenolic compounds in soil as influenced the growth of different plant species. *J. Appl. Ecol.* **19**: 579-588.
- Whitelaw, M. A. 2000. Growth promotion of plants inoculated with phosphate solubilizing fungi. *Adv. Agron.* **69**: 99-144.
- Wild, 1993. Soils and the environment. An introduction, pp. 281. *In*: Cambridge price editions. Cambridge university press.
- Williams, P.G. 2009. Panning for chemical gold: marine bacteria as a source of new therapeutics. *Trends Biotechnol.* **27**: 45-52.

- Williams, S. T. et F. L. Davies. 1965. Use of antibiotics for selective isolation and enumeration of actinomycetes in soil. *J. Gen. Microbiol.* **38**: 251- 261.
- Wimalasekera, R., F. Tebartz et G. F. E. Scherer. 2011. Polyamines, polyamine oxydases and nitric oxide in development; abiotic and biotic stresses. *Plant Science.* **185** (5): 593-603.
- Winter, B., A. Fiechter et W. Zimmermann. 1991. Degradation of organochlorine compounds in spent sulfite bleach plant effluents by actinomycetes. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**(10): 2858-2863.
- Wu, R. Y et M. H. Chen. 1994. Studies of the biological characteristics and halophilism of a *Streptomyces* strain TA4-1. *Bot. Bull. Acad. Sin.* **35**: 233-242.
- Wu, Q.-L., S. P. Wang, G.-Z. Tu, Y.-X Feng et J.-S. Yang. 1997. Alkaloids from *Piper purberullum*. *Phytochemistry.* **44**: 727-730.
- Xu, X. M. Abo, A. Okubo et S. Yamazaki. 1998. Trehalose as osmoprotectant in *Rhodobacter sphaeroides* f. sp. *denitrificans* IL 106. *Int. Biblio. Inf. Diet. Suppl.* **62**: 334- 337.
- Yadav, J., J. Prakash et K. N. Tiwari. 2011. Plant growth promoting activities of fungi and their effect on chickpea plant growth. *Asian. J. Biol. Sci.* **04** (3): 291-299.
- Yamada, T., H.Hida et Y. Yamada. 2007. Isolation of hydroxycitric acid-producing *Streptomyces* sp. U121 and generation of improved mutants by genome shuffling. *Actinomycetol.* **21**(1): 40-45.
- Yang, C., J. Chong, C. Li, C. Kim, D. Shi et D. Wang. 2007. Osmotic adjustment and ion balance traits of an alkali resistant halophyte *Kochia sieversiana* during adaptation to salt and alkali conditions. **294**: 263-276.
- Yasseen, B. T. et R. F. Al-Thani. 2007. Halophytes and associated properties of natural soils in Doha area, Qatar. *Aquatic Ecosystem health and Management (AEHMS)* **10**: 320-326.
- Yasseen, B. T. et M. A. Abu-Al-Basal. 2010. Ecophysiology of Chenopodiaceae of the coastline of Arabian Gulf-Qatar: possible destruction and conservation perspective. *Euro. J. Sci. Res.* **39**: 90-104.
- Yokoi, S., R. A. Bressan et P. M. Hasegawa. 2002. Salt stress tolerance of plants. *JIRCAS Working Reports*: 25-33.

- Yurekli, F., H. Geckil et F. Topcuoglu. 2003. The synthesis of indole-3-acetic acid by the industrially important white-rot fungus *Lentinus sajor-caju* under different culture conditions. *Mycol. Res.* **107**: 305-309.
- Zaki, R. N. et T. E. E. Radwan. 2011. Improving wheat grain yield and its quality under salinity conditions at a newly reclaimed soil by using different organic sources as soil or foliar applications. *J. Appl. Sci. Res.* **07**(1): 42-55.
- Zhao, K., J. Song, G. Feng, M. Zhao et J. Liu. 2011. Species, types, distribution, and economic potential of halophytes in China. *Plant soil.* **342**: 495-509.
- Zhu, M., J. D. Phillipson, P. M. Greengrass, N. E Bower et Y. Cai. 1997. Plant polyphenols: biologically active compounds for non-selective binders to protein. *Phytochemistry.* **44**: 441-447.

PUBLICATIONS

THE OSMOPROTECTIVE EFFECT OF SOME ORGANIC SOLUTES ON *STREPTOMYCES* SP. MADO2 AND *NOCARDIOPSIS* SP. MADO3 GROWTH

Hanane Ameer^{1*}, Mostefa Ghou¹, Joseph Selvin²

¹ Laboratoire d'écologie microbienne, Département de Biologie, Faculté des sciences, Université Ferhat Abbas, Sétif 19000, Algeria; ² Marine Bioprospecting Laboratory, Department of Microbiology, Bharathidasan University, Tiruchirappalli 620 024, India.

Submitted: March 12, 2010; Returned to authors for corrections: May 19, 2010; Approved: November 04, 2010.

ABSTRACT

The response of two marine actinomycetes such as *Streptomyces* sp. MADO2 and *Nocardiosis* sp. MADO3 to osmotic stress in minimal medium M63 and in glycerol-asparagine medium (ISP5) was studied. The two strains were moderately halophilic and the behavior of the strain *Streptomyces* sp. MADO2 and *Nocardiosis* sp. MADO3 towards the salt stress was varied depends on the media composition and the salinity concentration. The strain *Streptomyces* sp. was more sensitive to salt stress than *Nocardiosis* sp. The growth of both *Streptomyces* sp. and *Nocardiosis* sp. were inhibited at 1 M NaCl irrespective of the medium used. The *Nocardiosis* sp. acquired osmoadaptation on ISP5 medium whereas the *Streptomyces* sp. showed poor growth on M63 medium. Glycine betaine (GB), proline and trehalose played a critical role in osmotic adaptation at high osmolarity whereas at low osmolarity they showed an inhibitory effect on the bacterial growth. The present findings confirmed that GB was the powerful osmoprotectant for *Streptomyces* sp. and *Nocardiosis* sp. grown at 1 M NaCl both in M63 and ISP5 media.

Key words: *Streptomyces* sp., *Nocardiosis* sp., osmoprotective effect, M63 medium, ISP5 medium.

INTRODUCTION

Actinomycetes are potential producers having immense application in industrial production processes. Their capacity to degrade complex organic compounds and to produce antibiotics has been demonstrated (1). Halophilic or salt tolerant actinomycetes are being developed as model organisms to disclose the mechanism and microbial physiology under extreme environments (3). Microorganisms found in

extreme environments have attracted a great attention due to their production of various natural compounds and their specialized mechanisms for adaptation to extreme environments (28). However, relatively little information was available on the osmoregulatory strategy of actinomycetes, even though needs a special attention because of their transitional nature between the simple eubacteria and the fungi (13, 19).

Most microorganisms subjected to water stress accumulate

*Corresponding Author. Mailing address: Laboratoire d'écologie microbienne, Département de Biologie, Faculté des sciences, Université Ferhat Abbas, Sétif 19000, Algeria.; E-mail: ameur_han@yahoo.fr

organic solutes to control their internal water activity, maintain the appropriate cell volume and turgor pressure, and protect intracellular macromolecules (8). Prokaryotes have developed two strategies to cope with increasing salinities. One is to accumulate and adjust the internal concentration of inorganic ions such as K^+ and Cl^- to values that counteract the external osmolarity (25). A different strategy is the accumulation of osmolytes or compatible solutes including sugars (trehalose), free amino acids (e.g., glutamate and proline), and quaternary ammonium compounds (e.g., glycine betaine, proline betaine, butyrobetaine, and carnitine) that bacteria accumulate from *de novo* synthesis or from externally provided osmoprotectants such as choline, the precursor of glycine betaine (19, 6, 16, 18).

The present study aims to analyze the effect of increasing osmolarity of NaCl (0-1 M) on the growth of *Streptomyces* sp. and *Nocardiopsis* sp. isolated from the marine sponge *Fasciospongia cavernosa* in minimal medium M63 and in glycerol-asparagine medium (ISP5 medium). It was a maiden initiative to use M63 medium to analyze the effect of increased salinity and osmoprotectants on the growth of actinomycetes strains. This minimal medium is generally used for the study of halotolerance of enteric bacteria. The osmoprotective effect of glycine betaine (GB), proline and trehalose was also studied.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains and antimicrobial screening

The marine actinomycetes such as *Streptomyces* sp. MADO2 and *Nocardiopsis* sp. MADO3 were obtained from marine bioprospecting laboratory, Bharathidasan University, Tiruchirappalli (India). Primary screening of antimicrobial activities was performed on Actinomycetes agar (Himedia) supplemented with 2% NaCl. The screening of the isolates was examined against *C. albicans* PC1, *E. coli* PC2, *P. mirabilis* PC3, *S. haemolytic*. PC4, *P. aeruginosa* PC5, *M. luteus* PC6, *S. epidermidis* PC7, *E. faecalis* PC8, *K. pneumoniae* PC9, *B. subtilis* PC10 and *S. aureus* PC11.

Medium and cultivating conditions

YM medium (19), containing 10 g of malt extract, 4 g of yeast extract, 0.01 g of $CaCl_2$ and 1 ml of trace salts solution (per 100 ml of water: 100 mg of $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 100 mg of $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, 100 mg of $ZnSO_4 \cdot H_2O$ and 100 mg of $CaCl_2$) was used for the preparation of the inoculum of the strains MADO2 and MADO3. Cells were grown aerobically for 72 h at 26°C on a rotary shaking incubator at 250 rpm. After centrifugation and washing with 0.9% NaCl solution, 1 ml of cell suspension served as the inoculum for 50 ml of culture in M63 and in ISP5 medium respectively. The inoculum contained 4.2×10^7 cfu/ml.

Effect of increased salinity on the bacterial growth

For NaCl endurance experiments, M63 medium [(g/l) KH_2PO_4 13.6 g, KOH 4.2 g, $(NH_4)_2SO_4$ 1.982 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.246 g, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.0005 g and glucose 1.8 g (4)] and ISP5 [(g/l) asparagine 1 g, glycerol 10 g, K_2HPO_4 1 g and 1 ml of trace salts solution (26)] were used as the basic media. The NaCl concentrations include: 0M, 0.1 M, 0.5 M, 0.8 M and 1 M were enriched in both media.

Osmoprotective effect of GB, proline and trehalose on the bacterial growth

To study the osmoprotective effect of osmoprotectants described above, the media supplemented with GB (1 mM), proline (1 mM) and trehalose (1 mM) were used. MADO2 and MADO3 strains were cultivated in M63 and ISP5 media aerobically at 26°C on a rotary shaking incubator at 100 rpm. Bacterial growth was monitored spectroscopically at 540 nm. The number of cells corresponding to the absorbance was counted using a Petroff-Hausser chamber

RESULTS

Antimicrobial activity

The two isolates were screened for their antimicrobial activities against the indicator strains as mentioned above. *Streptomyces* sp. showed a significant antimicrobial activity

against *C. albicans* PC1 (23 mm), *E. coli* PC2 (16 mm) *P. mirabilis* PC3 (26 mm), *M. luteus* PC6 (27 mm) and *S. aureus* PC11 (26 mm). It was more active than *Nocardioopsis* sp.

showed activity against *C. albicans* PC1 (14 mm), *E. coli* PC2 (00 mm), *P. mirabilis* PC3 (12 mm), *M. luteus* PC6 (23 mm) and *S. aureus* PC11 (19 mm) (Table 1).

Table 1. Antimicrobial activity of *Streptomyces* sp. MADO2 and *Nocardioopsis* sp. MADO3 on some clinical pathogens

Clinical pathogens	Inhibition zone (mm)	
	<i>Streptomyces</i> sp. MADO2	<i>Nocardioopsis</i> sp. MADO3
<i>C. albicans</i> PC1	23	14
<i>E. coli</i> PC2	16	00
<i>P. mirabilis</i> PC3	26	12
<i>H. streptococcus</i> PC4	12	08
<i>P. aeruginosa</i> PC5	13	16
<i>M. luteus</i> PC6	27	23
<i>S. epidermidis</i> PC 7	22	14
<i>E. faecalis</i> PC 8	16	13
<i>K. pneumoniae</i> PC 9	08	11
<i>B. subtilis</i> PC 10	23	22
<i>S. aureus</i> PC 11	26	19

Growth characteristics of strains MADO2 and MADO3 in M63 and ISP5 media

The growth characteristics of *Streptomyces* sp. was compared with those of *Nocardioopsis* sp. using M63 and ISP5

media (Fig.1). The growth of *Streptomyces* sp. was favored irrespective of the media used. However, *Nocardioopsis* sp. growth was better in M63 medium than in ISP5 medium.

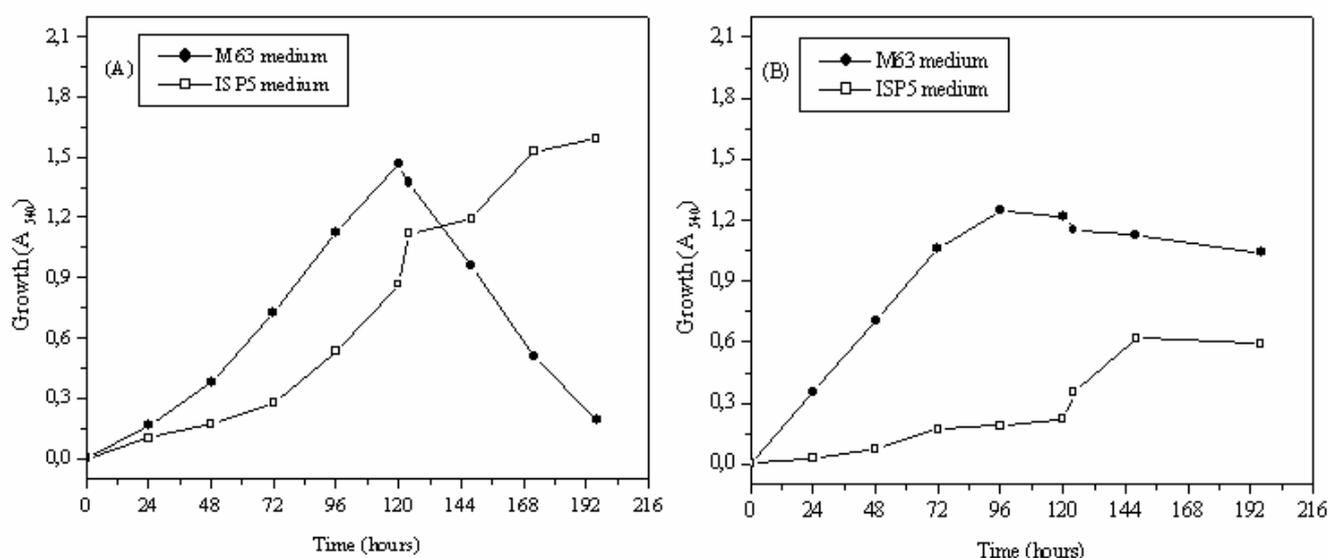


Figure 1. Growth characteristics of *Streptomyces* sp. MADO2 (A) and *Nocardioopsis* sp. MADO3 (B) grown in M63 medium and ISP5 medium.

Effect of increased osmolarity on the bacterial growth

To analyze the response of *Streptomyces* sp. and *Nocardiosis* sp. to increased osmolarity, cells were cultivated in M63 and ISP5 media containing 0-1 M NaCl. Exposure to elevated osmotic strength reduced the growth of *Streptomyces*

sp. At 0.5 M NaCl, the growth rate decreased significantly in both M63 and ISP5 media (Fig. 2). The effect of increased salinity on the growth of *Nocardiosis* sp. was different to that of *Streptomyces* sp. The increase in growth occurred beyond 0.5 M NaCl, a drastic decline of growth was observed (Fig. 3).

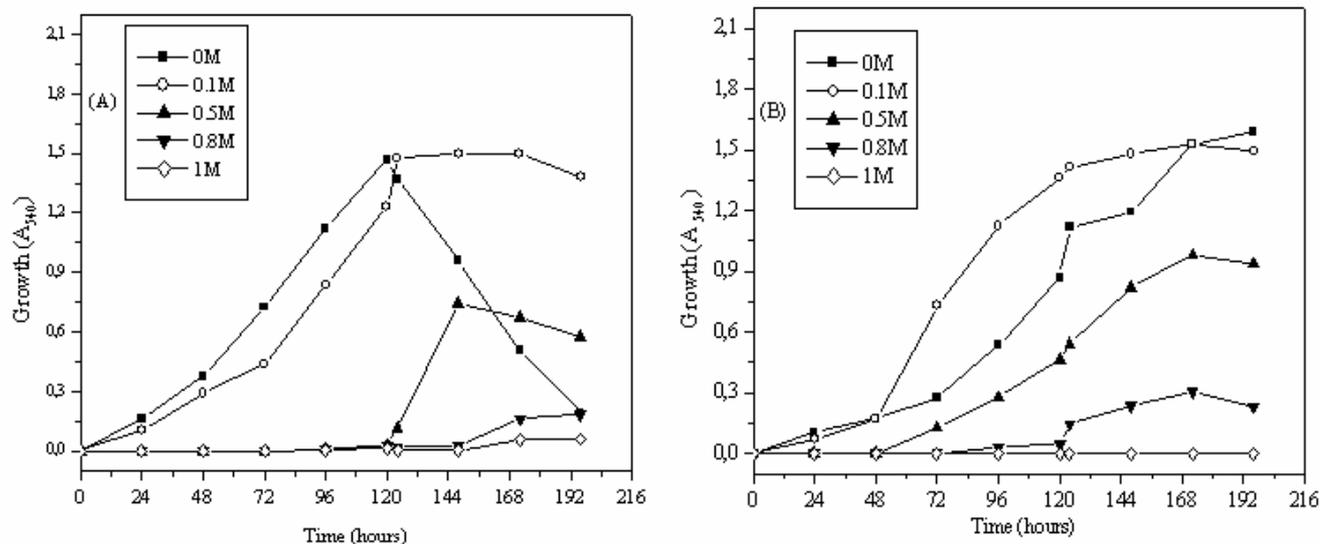


Figure 2. Growth of *Streptomyces* sp. (MADO2) of increased salinity in: M63 medium (A) and in ISP5 medium (B).

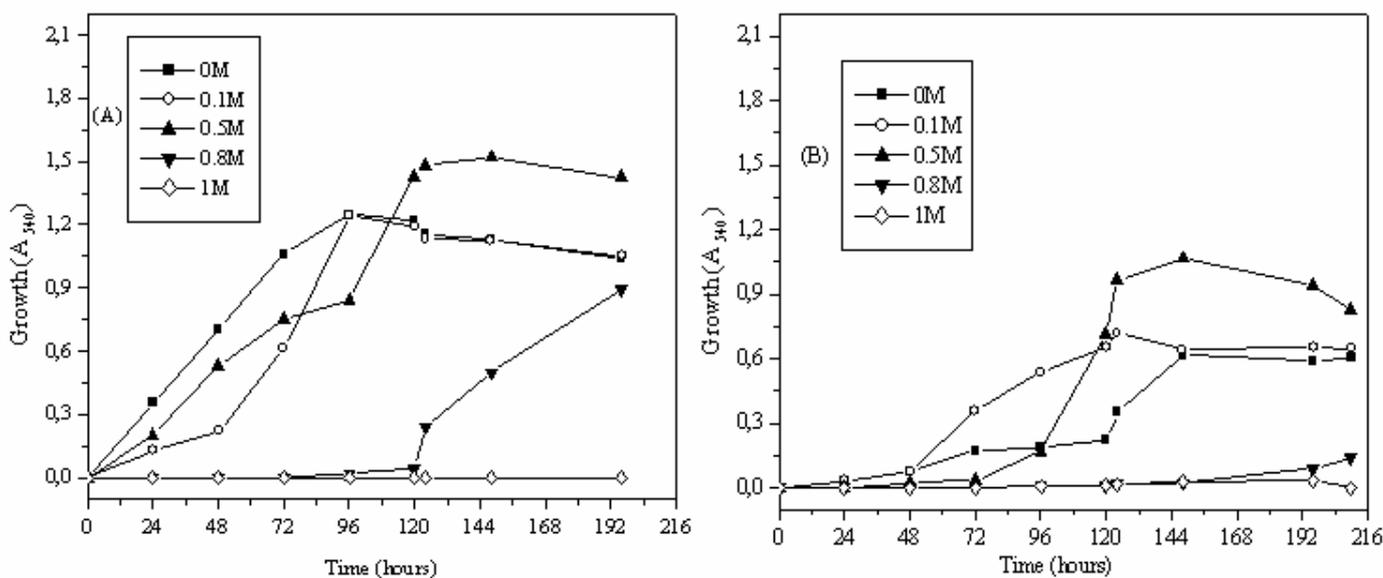


Figure 3. Growth of *Nocardiosis* sp. (MADO3) of increased salinity in: M63 medium (A) and in ISP5 medium (B).

Effect of GB, proline and trehalose on the bacterial growth at different concentrations of NaCl

At 0.1 M NaCl, the supplementation of trehalose in M63 medium enhanced the growth of *Streptomyces* sp. whereas GB and proline showed an inhibitory effect on the growth. The condition was found to be entirely different in the case of

Nocardiosis sp. where the supplement of GB and proline enhanced the growth.

The ISP5 medium supplemented with osmoprotectants inhibited the growth of *Streptomyces* sp. whereas the osmoprotectants trehalose and proline stimulated the growth of *Nocardiosis* sp. (Fig .4).

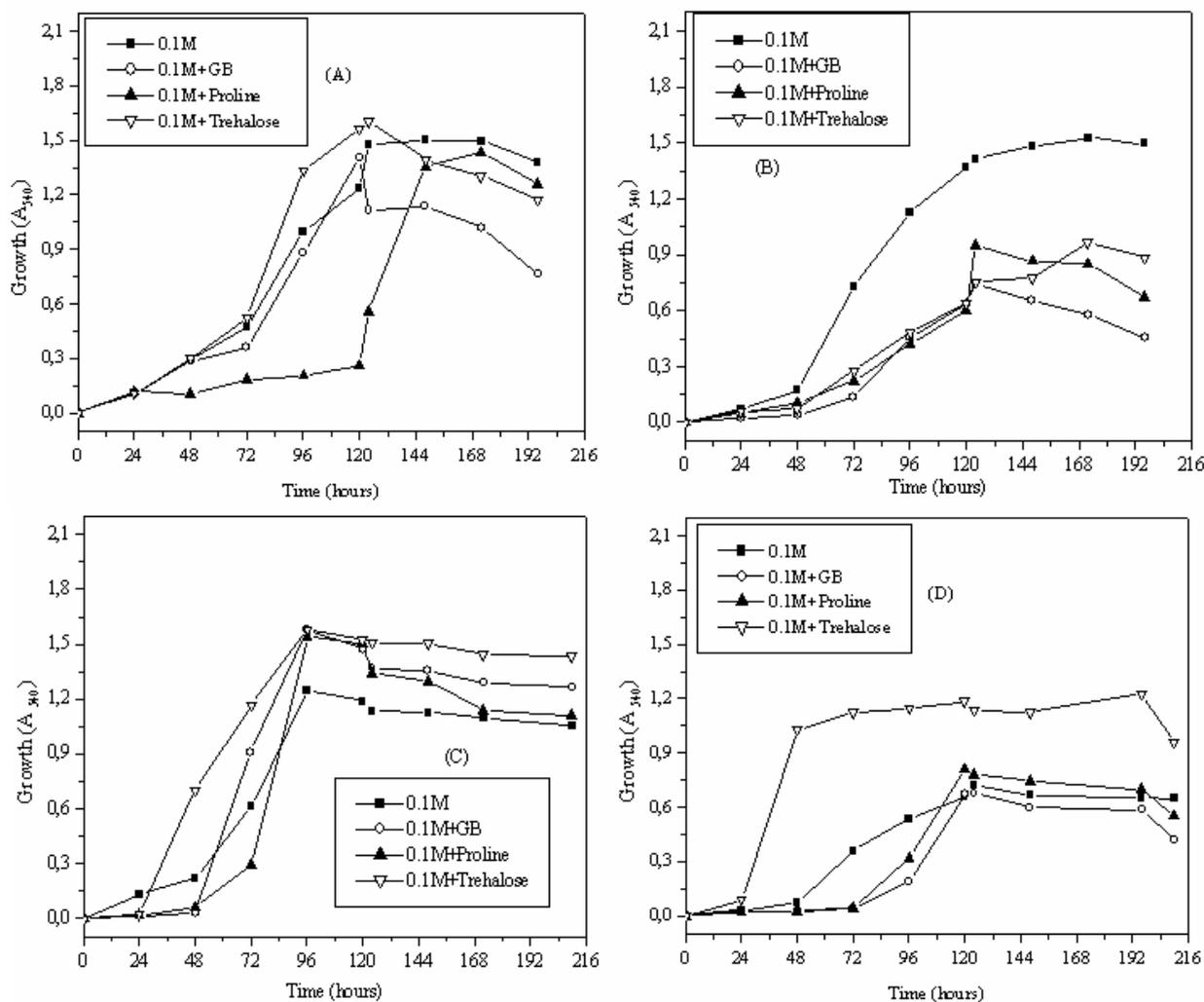


Figure 4. Growth of *Streptomyces* sp. MADO2 in M63 medium (A), in ISP5 medium (B) and *Nocardiosis* sp. MADO3 in M63 medium (C) and ISP5 medium (D) in presence of 0.1 M NaCl and/or GB, proline, trehalose (1 mM).

In presence of 0.5 M NaCl, both M63 and ISP5 media supplemented with GB, proline and trehalose showed an osmoprotective effect and enhanced the bacterial growth of

Streptomyces sp. Growth of *Nocardiosis* sp. was nearly the same in M63 medium with or without GB. Trehalose and proline acted positively on the growth of *Nocardiosis* sp.

However, the growth was reduced in ISP5 medium supplemented with GB and proline. But trehalose stimulated the growth of *Nocardioopsis* sp. (Fig. 5).

Growth of *Streptomyces* sp. and *Nocardioopsis* sp. were greatly increased at 0.8 M NaCl in M63 medium supplemented with GB, proline and trehalose. However, it is noteworthy that

trehalose was more effective than GB and proline. *Nocardioopsis* sp. growth was stimulated significantly in ISP5 medium with GB. Trehalose and proline stimulated the growth of *Streptomyces* sp. Hence, we conclude that trehalose was the potent osmoprotectant stimulating the growth of *Streptomyces* sp. besides GB and proline (Fig. 6).

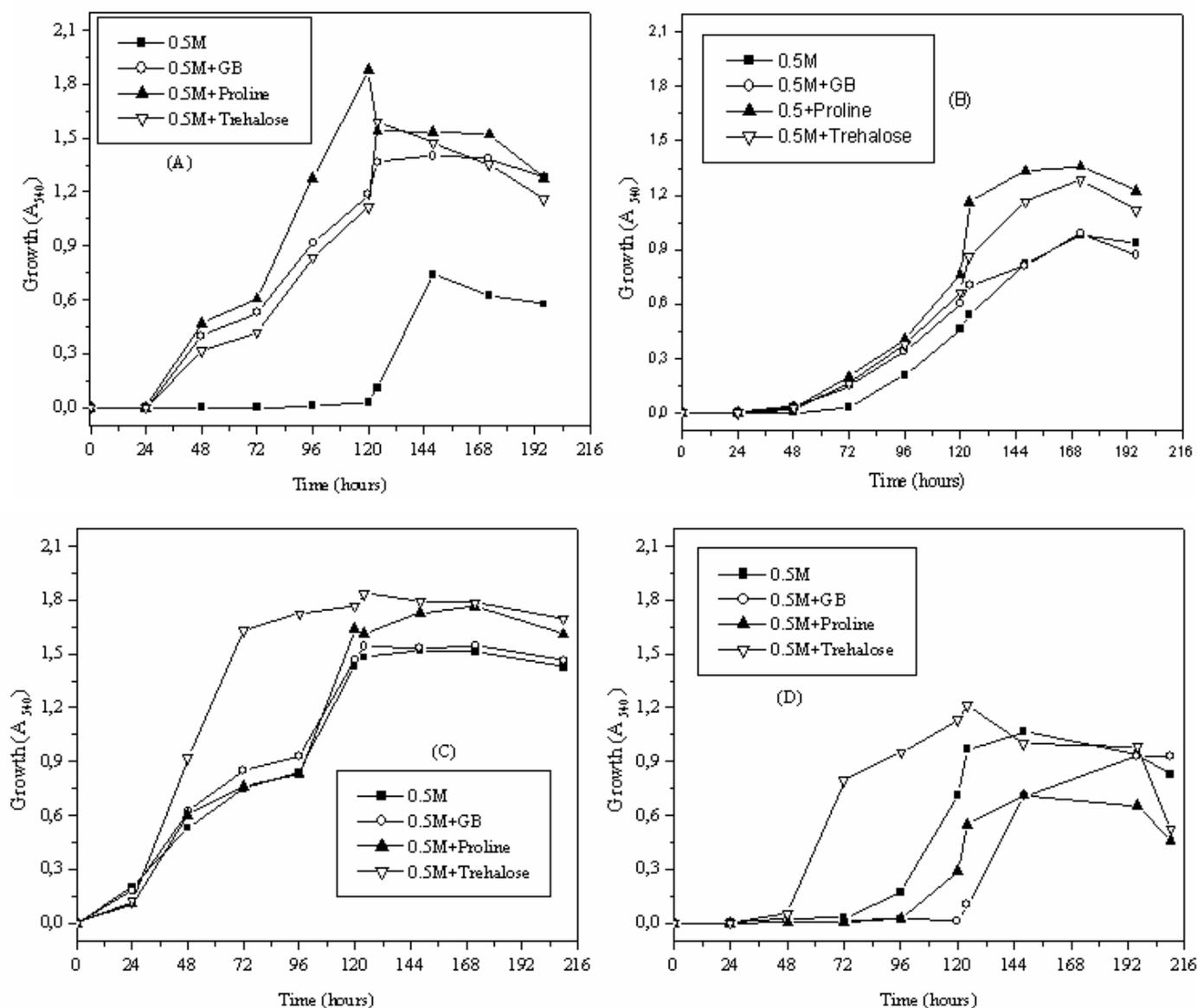


Figure 5. Growth of *Streptomyces* sp. MADO2 in M63 medium (A), in ISP5 medium (B) and *Nocardioopsis* sp. MADO3 in M63 medium (C) and ISP5 medium (D) in presence of 0.5 M NaCl and/or GB, proline, trehalose (1 mM).

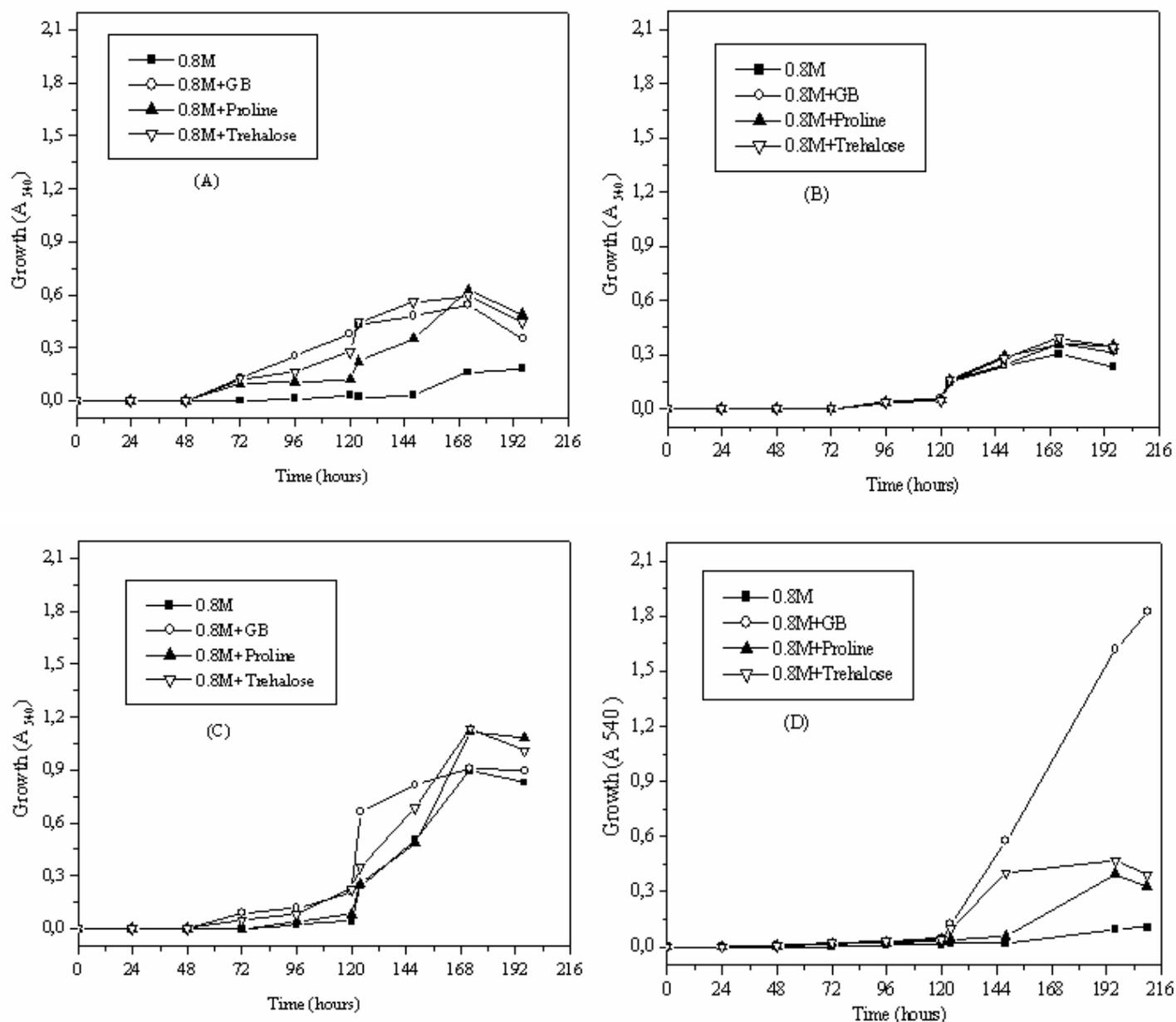


Figure 6. Growth of *Streptomyces* sp. MADO2 in M63 medium (A), in ISP5 medium (B) and *Nocardiopsis* sp. MADO3 in M63 medium (C) and ISP5 medium (D) in presence of 0.8 M NaCl and/or GB, proline, trehalose (1 mM).

In M63 medium supplemented with 1 M NaCl, GB was the most efficient osmoprotectant stimulating the growth of *Streptomyces* sp. and *Nocardiopsis* sp. in comparison with proline and trehalose. Moreover, little or no growth was observed in *Streptomyces* sp. and *Nocardiopsis* sp. respectively

without osmoprotectants. In ISP5 medium, GB proved to be a potent osmoprotectant stimulating the growth of *Streptomyces* sp. However, its osmoprotective effect was negligible for *Nocardiopsis* sp. (Fig. 7).

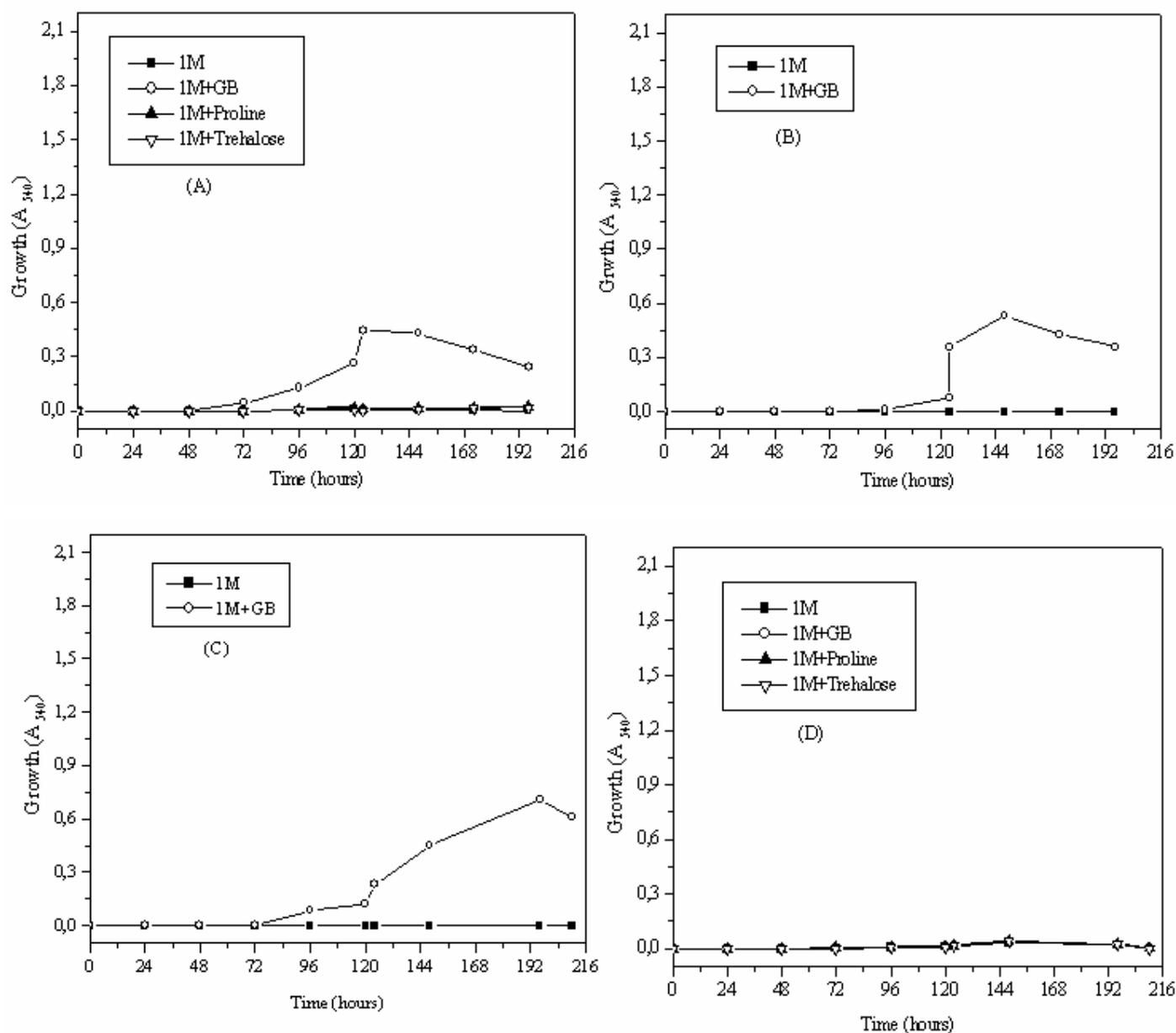


Figure 7. Growth of *Streptomyces* sp. MADO2 in M63 medium (A), in ISP5 medium (B) and *Nocardiopsis* sp. MADO3 in M63 medium (C) and ISP5 medium (D) in presence of 1 M NaCl and/or GB, proline, trehalose (1 mM).

DISCUSSION

Marine organisms produce enormous antibiotics chemicals. They are emerging as an exciting species for the discovery of new classes of therapeutics and it could provide the drugs needed to sustain us for the next 100 years in our

battle against drug resistant infectious diseases (30). Our results showed that the two strains had an antimicrobial activity against the clinical pathogens tested. *Nocardiopsis* sp. VITSVK5 (FJ973467) isolated from marine sediment samples collected at the Puducherry coast of India showed a significant antibacterial activity against Gram negative bacteria- *E. coli*

(20 mm), *P. aeruginosa* (18 mm) and *K. pneumonia* (15 mm) and Gram positive bacteria- *E. faecalis* (20 mm), *B. cereus* (13 mm) and *S. aureus* (6 mm). They also showed an antifungal activity against *A. fumigatus* (23 mm), *A. flavus* (15 mm) and *A. niger* (12 mm) (29).

It was found that the behavior of the two strains towards salt stress was different depending on the type of the medium used and the degree of salinity. The absence of NaCl promoted the growth of *Streptomyces* sp. irrespective of the media used. However, *Nocardioopsis* sp. growth was better in M63 medium than in ISP5 medium. It was found that *Streptomyces* sp. utilized both glucose and glycerol as carbon source, while *Nocardioopsis* sp. utilized glucose as sole carbon source. Growth of *Streptomyces clavuligerus* strain Mit-1 grown on different media has been studied (11). The growth was very low in ISP5 medium than in the other media like Actinomycete broth (maximal growth) or in Gelatin casaminoacid broth. Moreover, various sugars were investigated in the same study for their effect on the bacterial growth. Glucose was the best carbon source comparative to lactose, maltose, sucrose and xylose. It should be noted that growth of *Streptomyces* sp. and *Nocardioopsis* sp. decreased in M63 medium. This is can be explained by the poor composition of this minimal medium which contains only glucose as carbon source. In the presence of increased osmolarity, it was obtained that the two strains are moderately halophilic. Halophilic bacteria and actinomycetes have been grouped according to salinity requirements by microbiologists. The method of classification proposed by Kushner (15) appears to be the most popular one.

Streptomyces sp. was more sensitive to salt stress than *Nocardioopsis* sp. while *Nocardioopsis* sp. showed an optimum growth at 0.5 M NaCl. It was observed that *Nocardioopsis* sp. requires 3% of NaCl for its growth while *Streptomyces* sp. requires 0.58% of NaCl. At 0.8 M NaCl, *Streptomyces* sp. growth decreased significantly in M63 medium than in ISP5 medium. It has demonstrated that polyols like glycerol, arabitol and inositol are typical compatible solutes of

halophilic/halotolerant fungi, algae, bacteria and plants (7). For *Nocardioopsis* sp., its growth was considerable in M63 medium than in ISP5 medium. This is can be explained by the fact that *Nocardioopsis* sp. synthesizes trehalose from glucose, which is an ingredient of M63 medium. We noted that M63 medium contains 10 mM glucose, which allowed the stressed-cells to accumulate trehalose as an osmoprotectant. According to McBride and Ensign (21), spores of *Streptomyces griseus* grown on DMC medium containing 200 mM glucose contain 21% of their dry weight as trehalose while spores grown on media containing 20 mM glucose contained 1.2% of their dry weight as trehalose. The relationship between glucose concentration in the medium and trehalose content of spores was essentially linear between 5 and 100 mM glucose. It has been mentioned that trehalose is widespread disaccharide occurring in eukaryotic and prokaryotic alike. Because they are often observed in slightly halotolerant of marine organisms growing at 3% NaCl (0.5 mol/l) or just above, a prospective role as osmolytes was assumed (7).

At 1 M NaCl, growth of *Streptomyces* sp. and *Nocardioopsis* sp. was totally inhibited in both ISP5 and M63 media. Poor growth of *Streptomyces* sp. was observed in M63 medium. An osmoadaptation was acquired for *Nocardioopsis* sp. in ISP5 medium. It seems possible that the two strains accumulated or synthesized osmolytes to regulate response to osmotic stress.

Concerning the osmoprotective effect of GB, proline and trehalose, it was observed that the three components play a critical role in osmotic adaptation at high osmolarity whereas at low osmolarity they may have an inhibitory effect on the bacterial growth. Unfortunately, very little is known about the NaCl tolerance, the halophilism and the osmoadaptation of actinomycetes. Further research warranted to explore whether actinomycetes respond to osmotic stress in a way similar to halophilic bacteria or not and their compatible solutes are the same nature as observed in eubacteria (31).

Based on the present findings, the GB has an inhibitory

effect at 0.1 M NaCl on the growth of *Nocardioopsis* sp. in ISP5 medium whereas proline and trehalose stimulated its growth. The inhibitory effect of GB, proline and trehalose was also observed in *Streptomyces* sp. grown in ISP5 medium whereas only GB and proline inhibited the growth of this strain in M63 medium. *Nocardioopsis* sp. growth was also inhibited in ISP5 medium at 0.5 M NaCl by adding GB and proline. However, it should be noted that an osmoprotective effect of GB, proline and trehalose on the growth of *Streptomyces* sp. both in M63 and ISP5 media at 0.5 M NaCl was observed. Therefore, it is noteworthy that the inhibitory effect of GB and proline particularly on the bacterial growth depending not only on the salinity range (low osmolarity) rather the effect also duo to the nature of the culture media. The observations concerning the inhibitory effect of GB, proline and trehalose were similar to that of previous reports (9, 12, 23) which have also demonstrated that GB and other osmoprotectants had an inhibitory effect on growth of *Lactococcus lactis*.

The osmoprotective effect of GB, proline and trehalose on the two strains has shown only at inhibitory salinities. Proline is the main compatible solute in *Streptomyces* sp. at 0.5 M NaCl grown in M63 medium and in ISP5 medium. GB and proline are two major organic osmolytes that accumulate in a variety of plant species (2) and in many microorganisms (5) in response to environmental stresses. In *Salmonella oranienburg*, exogenous proline could alleviate the growth inhibition imposed by osmotic stress (5). It is also often observed that proline is raised in a salt stress situation as in *Streptomyces* sp (7). Furthermore, addition of 12.5 mM proline to the growth medium increased the specific growth yield of *Streptomyces griseus* (14). At 0.8 M NaCl, trehalose confers an osmoadaptation in *Streptomyces* sp. in both M63 and ISP5 media. Trehalose stimulates *Nocardioopsis* sp. growth besides GB and proline. Trehalose is known to stabilize membranes, proteins and whole cell during dehydration and storage. It participates in some way to alleviate osmotic stress and that trehalose is primarily a stress metabolite associated with the onset of unfavorable growth conditions (7). Trehalose is also

the major organic osmoprotectant in *Rhodobacter sphaeroides* f. sp. *denitrificans* IL 106 (32). Obtained results confirmed that GB was the powerful osmoprotectant in *Streptomyces* sp. grown at 1 M NaCl in both M63 and ISP5 media and for *Nocardioopsis* sp. grown in M63 medium. Glycine betaine has been generally regarded as a superior protective osmolyte for *E. coli* and has been shown to increase tolerance to sugars, salts and organic acids (5, 22). Glycine betaine is of general importance for osmotic adaptation of most eubacteria (10). It is the most efficient osmoprotectant characterized to date (27). The transport and the accumulation of GB are triggered by raising the osmotic pressure of the external environment (17, 24, 20). The main results proved that the osmoprotective effect of GB, proline and trehalose in *Streptomyces* sp. and *Nocardioopsis* sp. was shown only at inhibitory salinities whereas at low osmolarity they had an inhibitory effect on the bacterial growth.

REFERENCES

1. Al-Zarban, S. S.; Al-Musallam, A. A.; Abbas, I. H.; Fasasi, Y. A. (2002). Noteworthy salt-loving actinomycetes from Kuwait. *Kuwait. S. Sci. Eng.*, 29, 99-109.
2. Ashraf, M.; Foolad, M. R. (2007). Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. *Environmental and Experimental Botany*, 59, 206-216.
3. Cai, Y.; Xue, Q.; Chen, Z.; Zhang, R. (2009). Classification and salt-tolerance of actinomycetes in the Qinghai Lake water and Lakeside saline soil. *J. Sust. Dep.*, 02, 107-110.
4. Cohen, G. N.; Rickenberg, H. V. (1956). Concentration spécifique réversible des amino-acides chez *Escherichia coli*. *Ann. Inst. Pasteur*, 91, 693-720.
5. Csonka, L. N. (1989). Physiological and genetic responses of bacteria to osmotic stress. *Microbiol. Rev.*, 53, 121-147.
6. Csonka, L. N.; Epstein, W. (1996). *Escherichia* and *Salmonella*: cellular and molecular biology. In: Neidhardt, F. C., Curtis, R., Ingraham, J. L., Lin, E. C. C., Low, K. B., Magasanik, B., Reznikoff, W. S., Riley, M., Schaechter, M. and Umberger, H. E (eds). Osmoregulation, p. 1210-1223.
7. da Costa, M. S.; Santos, H.; Galinski, E. A. (1998). An overview of the

- role and diversity of compatible solutes in bacteria and archaea. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology.*, 61, 117-149.
8. Galinski, E. A. (1995). Osmoadaptation in bacteria. *Adv. Microb. Physiol.*, 37, 273-328.
 9. Glaasker, E.; Konings, W. N.; Poolman, B. (1996). Osmotic regulation of intracellular solute pools in *Lactococcus plantarum*. *J. Bacteriol.*, 178, 575-582.
 10. Imhoff, J. F.; Rodriguez-Valera, F. (1984). Betaine is the main compatible solute of halophilic eubacteria. *J. Bacteriol.*, 160, 478-479.
 11. Jignasha, T. T.; Singh, S. P. (2007) Secretion of an alkaline protease from a salt-tolerant and alkaliphilic, *Streptomyces clavuligerus* strain Mit-1. *Braz. J. Microbiol.*, 38, 766-772.
 12. Kets, E. P.W.; Groot, M. N.; Galinski, E. A.; de Bont, J. A. M. (1997). Choline and acetylcholine: novel cationic osmolytes in *Lactococcus plantarum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 48, 94-98.
 13. Killham, K.; Firestone, M. K. (1984a). Salt stress control of intracellular solutes in *Streptomyces* indigenous to saline soils. *Appl. Environ. Microbiol.*, 47, 301-306
 14. Killham, K.; Firestone, M. K. (1984b). Proline transport increases growth efficiency in salt-stressed *Streptomyces griseus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 48, 239-241.
 15. Kushner, D.J. (1978). Life in high and solute concentrations: halophilic bacteria. In: Kushner, D.J (ed). *Microbial life in extreme environments*, Academic Press, Ltd, London, p. 317-368.
 16. Lamosa, P.; Martins, L. O.; Da Costa, M. S.; Santos, H. (1998). Effects of temperature, salinity, and medium composition on compatible solute accumulation by *Thermococcus* spp. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64, 3591-3598.
 17. Le Rudulier, D.; Bouillard, L. (1983). Glycine betaine, an osmotic effector in *Klebsiella pneumoniae* and other members of the *Enterobacteriaceae*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 46, 152-159.
 18. Le Rudulier, D.; Mandon, K.; Dupont, L.; Trinchant, J. C. (2002). Salinity effects on the physiology of soil microorganisms. In: Bitton, G., John Wiley and Sons (eds). *The encyclopedia of environmental microbiology*, Inc., Hoboken, N.J, p. 2774-2789.
 19. Malin, G.; Lapidot, A. (1996). Induction of synthesis of tetrahydropyrimidine derivatives in *Streptomyces* strains and their effect on *Escherichia coli* in response to osmotic and heat stress. *J. Bacteriol.*, 178, 385-395.
 20. May, G.; Faatz, E.; Villagero, M.; Bremer, E. (1986). Binding protein dependant transport of glycine betaine and its osmotic regulation in *Escherichia coli* K 12. *Mol. Gen. Genet.*, 205, 225-233.
 21. McBride, M. J.; Ensign, J. C. (1987). Effects of intracellular trehalose content on *Streptomyces griseus* spores. *J. Bacteriol.*, 169, 4995-5001.
 22. Miller, E.N.; Ingram, L. O. (2007). Combined effect of betaine and trehalose on osmotic tolerance of *Escherichia coli* in mineral salts medium. *Biotechnol. Lett.*, 29, 213-217.
 23. Moleenar, D.; Hagting, A.; Alkema, H.; Driessen, A. J. M.; Konings, W. N. (1993). Characteristics and osmoregulatory roles of uptake systems for proline and glycine betaine in *Lactococcus lactis*. *J. Bacteriol.*, 175, 5438-5444.
 24. Perroud, B.; Le Rudulier, D. (1985). Glycine betaine transport in *Escherichia coli*: osmotic modulation. *J. Bacteriol.*, 161, 393-401.
 25. Saum, S. H.; Müller, V. (2007). Salinity-dependant switching of osmolyte strategies in a moderately halophilic bacterium: Glutamate induces proline biosynthesis in *Halobacillus halophilus*. *J. Bacteriol.*, 189, 6968-6975.
 26. Shirling, E.B.; Gottlieb, D. (1966). Methods for characterization of *Streptomyces* species. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 16, 313-340.
 27. Singh, L.R.; Dar, T.A.; Rahman, S.; Jamal, S.; Ahmad, F. (2009). Glycine betaine may have an opposite effects on protein stability at high and low pH values. *Biochimica et Biophysica Acta.*, 1794, 929-935.
 28. Tang, S.K.; Li, W.J.; Dong, W.; Zhang, Y.G.; Xu, L.H.; Jiang, C.L. (2002). Studies of the biological characteristics of some halophilic and halotolerant actinomycetes isolated from saline and alkaline soils. *Actinomycetol.*, 17, 06-10.
 29. Vimal V.; Rajan, B. M.; Kannabira, K. (2009). Antimicrobial activity of marine actinomycete, *Nocardiopsis* sp. VITSVK 5 (FJ973467). *Asian Journal of Medical Sciences.*, 1, 57-63.
 30. Williams, P.G. (2009). Panning for chemical gold: marine bacteria as a source of new therapeutics. *Trends Biotechnol.*, 27, 45-52.
 31. Wu, R. Y.; Chen, M.H. (1994). Studies of the biological characteristics and halophilism of a *Streptomyces* strain TA4-1. *Bot. Bull. Acad. Sin.*, 35, 233-242.
 32. Xu, X.; Abo, M.; Okubo, A.; Yamazaki, S. (1998). Trehalose as osmoprotectant in *Rhodobacter sphaeroides* f. sp. *denitrificans* IL 106. *Int. Biblio. Inf. Diet. Suppl.*, 62, 334- 337.



ORIGINAL RESEARCH ARTICLE

Screening of Actinomycetes Producing Antibacterial Substances and Indole Acetic Acid (IAA) and Optimization of Growth and IAA Production Conditions in *Streptomyces* sp. SF5

Hanane Ameur* and Mostefa Ghoul

Laboratory of applied microbiology, Faculty of natural science and life, University of Ferhat Abbas-Sétif, Algeria

Received 01 Mar 2012; Revised 03 Jun 2012; Accepted 08 Jun 2012

ABSTRACT

Starch-casein agar medium has allowed isolation of seven actinomycetes strains from a soil of the North of Algeria (Sétif). All the strains were able to produce antibacterial substances. The strain SF5 showed an antibacterial activity against all the pathogenic bacteria tested. The inhibition diameters for *P. aeruginosa*, *B.cereus*, *S. aureus*, *E. coli* and *S. typhimurium* were respectively; 18 mm, 12 mm, 12 mm, 10 mm and 7 mm. Furthermore, it is appeared the most efficient in terms of production of indole acetic acid ($55.58 \pm 0.7 \mu\text{g/ml}$) followed by the strain SF2 ($42.28 \pm 0.3 \mu\text{g/ml}$). Based on cultural and morphological characters, this isolate is designated as *Streptomyces*. Concerning the optimization of *Streptomyces* sp. SF5 growth and IAA production conditions, it was found that growth was maximal and IAA production reached a maximum of $104.76 \pm 0.2 \mu\text{g/ml}$ after 5 days when the culture medium was supplemented with 2mg/ml of L-tryptophan at pH 7 and incubated at 30°C. NaCl concentrations of 100, 200, 300 and mainly that of 500 mM had an inhibitory effect on both growth and IAA production.

Key words: isolation, *actinomycetes*, *Streptomyces* sp.SF5, antibacterial activity, indole acetic acid, optimization.

1. INTRODUCTION

Actinomycetes are Gram positive bacteria. They are considered the major group found in the soil and they are widely distributed [1]. Starch-casein medium was used in a lot of researches for the isolation of actinomycetes from soil and especially *Streptomyces* sp. [2]. It appeared the most appropriate medium for development of aerial mycelium and the selection growth of actinomycetes [3]. Great difficulty in actinomycetes classification exists; it is usually based on morphological characters and colour of aerial and vegetative mycelium. The analysis of the chemical composition of the cell wall is also widely studied [4].

Actinomycetes are included in the decomposition of organic matter [5] production of antibiotics, vitamins and enzymes [6]. In addition, some strains are endowed with the ability to solubilize phosphorus [7] and to produce indole acetic acid (IAA) [8]. Relatively, high percentages of actinomycetes isolated from soil synthesize antimicrobial substances; this shows an extremely important antagonist role in the soil. Streptomycetes only produce more than 75% of

antibiotics. *Streptomyces* and *Micromonospora* are the most described and studied. *Streptomyces* is actually considered one of the major sources of bioactive natural products [9]. Indole acetic acid is a common natural auxin and is a product of L-tryptophane metabolism of microorganisms. It influences on several parameters in the plant, namely elongation and cell division, apical dormancy and differentiation of vascular tissues [10]. According to [8], in some strains of *Streptomyces*, IAA has been found capable to stimulate the formation of mycelium and thus improve the production of antibiotics.

Our study is aimed to the isolation of actinomycetes from the soil and the screening of the most efficient strain in terms of production of antibacterial substances and indole acetic acid. Furthermore, growth and IAA production were tested under different conditions by studying the effect of L. tryptophan concentrations, pH, temperature and salinity.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. Actinomycetes isolation

A fertile soil collected from El-Ourissia region, North of Algeria (Sétif) was used for the actinomycetes isolation. Heat treatment was performed by holding the soil sample in a water bath (50°C for 60 min) to prevent growth of other bacteria. Starch-casein agar medium (g/l): starch 10, casein 0.3, KNO₃ 2, NaCl 2, K₂HPO₄ 2, MgSO₄·7H₂O 0.05, CaCO₃ 0.02, FeSO₄·7H₂O 0.01 and agar 18 was supplemented with griseofulvin (25 µg/ml), nystatin (10 µg/ml) and nalidixic acid (10 µg/ml) and was used for actinomycetes isolation; the inoculated plates were incubated at 30°C for seven days [11].

2.2. Antibacterial activity

The antibacterial activity was performed by using the agar disc method. Actinomycetes strains isolated were grown on GLM medium of the following composition (g/l): yeast extract 5, malt extract 3, peptone 5, glucose 10, agar 20, the pH was adjusted to 7.2. Growth lasted 7 days at 30°C, and then the colonies were removed and placed on Muller-Hinton medium, previously inoculated with strains of *Escherichia coli* ATCC 25922, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and *Salmonella typhimurium*. Cultures were set at 4°C for 4 hours and incubated at 37°C for 18-24 hours, and then the inhibition diameters (mm) were measured [12].

2.3. Indol acetic acid production

To determine the ability of actinomycetes strains isolated to produce indol acetic acid, a production test was performed by using the method of Bano and Musarrat [13]. The cultures were grown in YM medium of the following composition (g/l): malt extract 3, yeast extract 3, peptone 5, glucose 5, agar 18, the pH was adjusted to 7.2. The strain was incubated at 30°C for 3 days. Disks (8-10 mm) in diameter of grown colonies are then transferred into 5 ml of medium (YM) containing 2 mg/ml of L-tryptophan. The culture was then incubated at 30°C on a rotary shaking (125 rpm) for 4 days. After centrifugation (11,000 × g/15 min), 1 ml of the supernatant was mixed with 2 ml of Salkowsky reagent. The solution was vortexed and kept at room temperature for 20 min. The appearance of a pink colour indicates the production of the IAA. Optic density was determined at 530 nm and the levels of IAA are determined in µg/ml.

2.4. Study of optimum conditions for growth and IAA production

To determine the best conditions for growth and IAA production in SF5 strain, different parameters were studied: L-tryptophan concentrations (2, 5 and 7mg/ml), pH levels (5, 6, 7, 8 and 9), temperature (25°C, 30°C and 37°C) and NaCl concentration (100, 200, 300 and 500mM). The cultures were supplemented with 2mg/ml of L-tryptophan and the samples were drawn every 24 hours for 7 days. Bacterial growth was determined at 540 nm.

3. RESULTS

3.1. Actinomycetes isolation

Isolation of actinomycetes from a fertile soil (North of Algeria) using starch-casamino acid has allowed the selection of seven strains (Fig 1).

3.2. Antibacterial activity

The antibacterial activity of actinomycete strains isolated from soil showed that isolated actinomycetes had a heterogeneous antagonistic activity against the pathogenic bacteria tested. However, the strain SF5 appeared most efficient (Table 1).

3.3. IAA production

All actinomycetes strains produce IAA but with variable rates. The strain SF5 produced high level compared to other strains (55.58 ± 0.7 µg/ml) (Table 2).

3.4. Growth and IAA production conditions optimization

3.4.1. Effect of L-tryptophan concentrations

Our results showed that growth was maximal and IAA production reached a maximum of 104.76 ± 0.2 µg/ml when the culture medium was supplemented with 2mg/ml of L-tryptophan (Fig 2).

3.4.2. Effect of pH

Acid and alkaline pH had a negative effect on growth and IAA production. The production of IAA is highest (100.02 ± 0.4 µg/l) at pH=7. Low levels of IAA are mainly obtained at pH=5 (53.41 ± 0.4 µg/ml) and pH=9 (37.7 ± 0.2 µg/ml) (Fig 3).

3.4.3. Effect of temperature

A temperature of 30°C seems favourable for growth and IAA production which reached a maximum of 104.76±0.6µg/ml at this temperature. At 25°C, growth was relatively similar to that observed at 30°C. For the production of IAA, high level was also obtained (91.27 ± 0.5 µg/ml) (Fig 4).

3.4.4. Effect of NaCl concentrations

Concentration of 500mM of NaCl had an inhibitory effect on growth and IAA production.

IAA concentrations at 0 and 500mM of NaCl were respectively $104.76 \pm 0.6 \mu\text{g/ml}$ and $47.43 \pm 0.2 \mu\text{g/ml}$ (Fig 5).

Table 1: Antibacterial activity of isolated actinomycetes against some pathogenic bacteria

Actinomycetes strain type	Zone of inhibition in (mm)				
	<i>E. coli</i>	<i>B.cereus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. typhimurium</i>
SF1	18 mm	12 mm	-	7 mm	9 mm
SF2	10 mm	19 mm	6 mm	-	8 mm
SF3	16 mm	15 mm	-	-	8 mm
SF4	7 mm	8 mm	10 mm	6 mm	4 mm
SF5	10 mm	12 mm	12 mm	18 mm	7 mm
SF6	12 mm	5 mm	6 mm	-	6 mm
SF7	10 mm	4 mm	-	12 mm	4 mm

- Indicates absence

Table 2: Indole acetic acid production by the isolated actinomycetes

Actinomycetes strain	Indole acetic acid ($\mu\text{g/ml}$)
SF1	33.71 ± 0.3
SF2	42.28 ± 0.3
SF3	40.85 ± 0.2
SF4	38.57 ± 0.5
SF5	55.58 ± 0.7
SF6	18.57 ± 0.4
SF7	23.57 ± 0.6

Fig 1: Telluric actinomycetes strains isolated by using starch-casamino acid medium



Fig. 2: Effect of L-tryptophan concentrations on SF5 actinomycete strain growth (A) and IAA production (B)

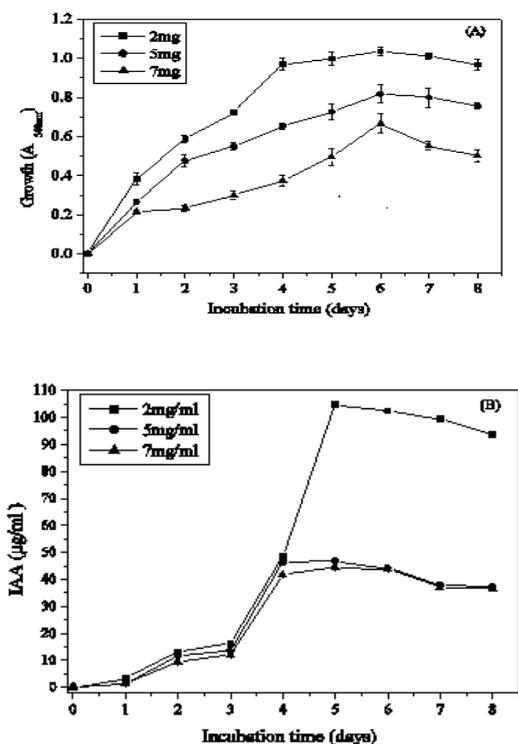


Fig 3: Effect of pH on SF5 actinomycete strain growth (A) and IAA production (B)

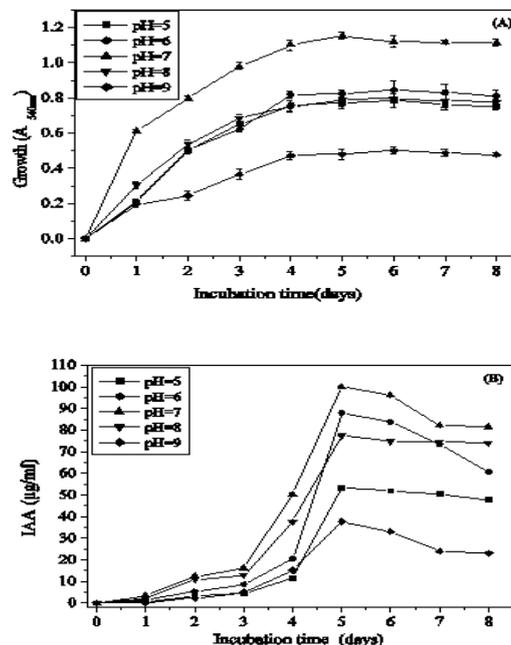


Fig 4: Effect of temperature on SF5 actinomycete strain growth (A) and IAA production (B)

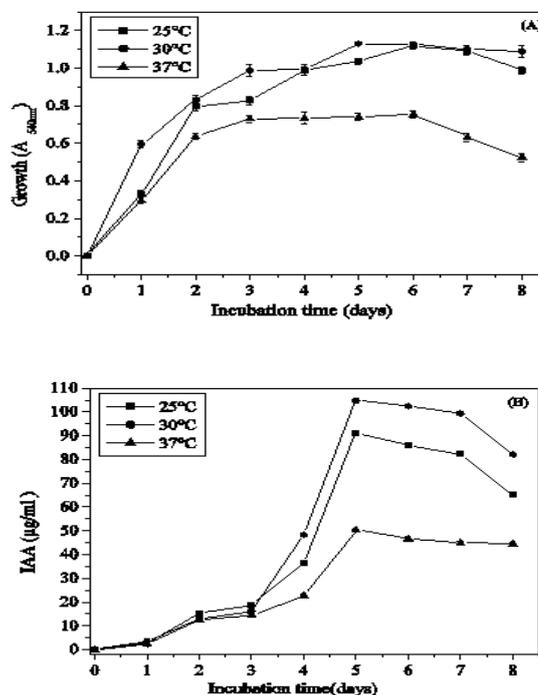
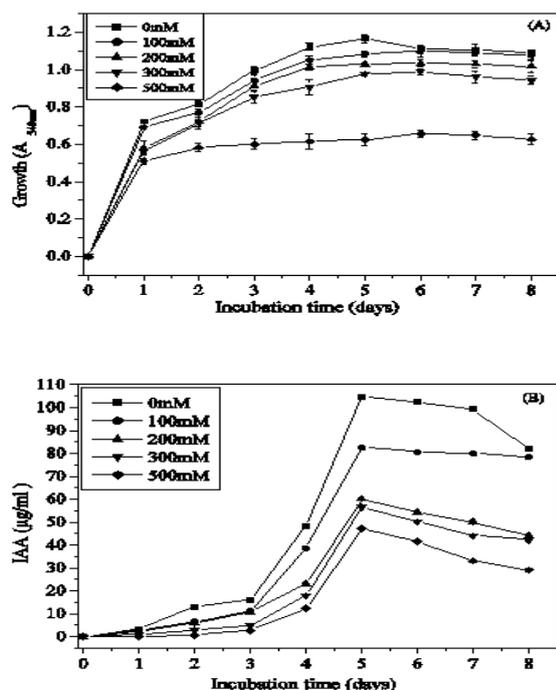


Fig 5: Effect of NaCl concentrations on SF5 actinomycete strain growth (A) and IAA production (B)



4. Discussion

In our study, heat treatment of soil (50°C for 60 min) reduced the number of Gram-negative bacteria [11]. All isolated bacteria are Gram-positive having a mycelian cellular aspect. The number of actinomycetes was $2.5 \cdot 10^5$ CFU/ml and seven strains of actinomycetes were isolated. According to [14], four different pretreatments were used to isolate the maximum of actinomycetes. Treatment of 70°C for 15 min gave $2.2 \cdot 10^7$ CFU/ml, while treatment of 100°C for 60 min allowed the isolation of $4.1 \cdot 10^6$ CFU/ml and that of 55°C for 60 min gave $1.6 \cdot 10^7$ CFU/ml. The heat treatment had probably participated in the selection of actinomycetes and inhibition of Gram-negative bacteria [15], the effect of nalidixic acid was also involved. [16] Reported that the use of antibiotics is extremely useful for inhibition of bacteria and promotion of actinomycetes growth. According to [3], antifungics supplemented to the growth medium inhibited growth of most fungi, while they had no adverse effect on the growth of actinomycetes despite the increase in their concentrations (50 µg/ml).

On the other hand, starch-casein medium was used as a selective medium for actinomycetes isolation; it contains selective substrates (starch and casein) which favourite actinomycetes growth, *Streptomyces* sp. for example, has been isolated from arid soils [2]. Mature colonies of SF5 strain are dry, dusty and flat edges and do not easily lift from the agar, they are characterized by an "earthy" odour, and this form characterizes

Streptomyces genus colonies [17]. *Streptomyces* colonies can be easily identified by their opaque, rough, non-spreading morphology and are usually embedded resulting in adherence to agar medium. The colour of substrate and aerial mycelia was variable; however, almost any colony gave an earthy odour that is characteristic of *Streptomyces* [18]. In addition, the strain SF5 had good growth on starch-casein medium; colour of aerial mycelium was white, while the vegetative mycelium was yellow. Based on cultural and morphological characters [19], this isolate is designated as *Streptomyces*. In soil, the streptomycetes are considered the most common bacteria, and they often constitute the major proportion of the actinomycetes population. When the conventional techniques of isolation are applied, most isolates of actinomycetes identified as *Streptomyces*, which is the most common genus found in the soil [20]

Actinomycetes are known to produce more than 70% of the natural antibiotics in the world, mainly those belonging to the genus *Streptomyces*, which is considered the most important type of soil actinobacteria [21]. Our study showed that actinomycete strains were active against the pathogenic bacteria tested with different degree. The strain SF5 identified as *Streptomyces* sp. was the most efficient, it shown an antibacterial activity towards all the bacterial strains beside SF4 strain (Table 1). *Streptomyces* sp. constitutes 50% of the population of terrestrial actinomycetes and 75% of antibiotics are produced by this genus [22]. *Streptomyces* sp. MADO2 and *Nocardioopsis* sp. MADO3 were screened for their antimicrobial activities. *Streptomyces* sp. showed a significant antimicrobial activity against *C. albicans* PC1 (23 mm), *E. coli* PC2 (16 mm), *P. mirabilis* PC3 (26 mm), *M. luteus* PC6 (27 mm) and *S. aureus* PC11 (26 mm). It was more active than *Nocardioopsis* sp. showed activity against *C. albicans* PC1 (14 mm), *E. coli* PC2 (00 mm), *P. mirabilis* PC3 (12 mm), *M. luteus* PC6 (23 mm) and *S. aureus* PC11 (19 mm) [23].

Indole acetic acid (IAA) is considered as the most active compound among the auxins. It is issue from the metabolism of L-tryptophan in many microorganisms (24), including fungi and bacteria [25]. Studies on the screening of actinomycetes producing IAA were shown that *Streptomyces* sp. is the genus the most involved in the IAA production [26].

The results of the screening of actinomycetes producing high levels of IAA showed that

Streptomyces sp. SF5 produce 55.58 ± 0.7 $\mu\text{g/ml}$ comparatively to the other strains. According to [27], actinomycetes isolated from the rhizosphere of some medicinal plants produce IAA with concentrations ranging from 11-144 $\mu\text{g/ml}$. For certain strains of *Pseudomonas* sp. and *Azotobacter* sp, IAA is produced in a range of 20-36 $\mu\text{g/ml}$ and 5-24 $\mu\text{g/ml}$ when the medium was supplemented with 2 mg/ml of L-tryptophan [28]. The addition of various concentrations of L-tryptophan showed a heterogeneous effect on growth and IAA production of *Streptomyces* sp. SF5. A concentration of 2 mg/ml seems favourable for IAA production; it allowed production of 104.76 ± 0.2 $\mu\text{g/ml}$ of IAA after 5 days of incubation. The levels of IAA obtained in the presence of 5mg/ml 7mg/ml and L-tryptophan were respectively 46.93 ± 0.4 $\mu\text{g/ml}$ and 44.38 ± 0.4 $\mu\text{g/ml}$.

Some *Rhizobium* strains isolated from the roots of *Sesbania procumbens* produce IAA with a rate of 30.2 $\mu\text{g/ml}$ after three days of incubation in the presence 3 mg/ml of L-tryptophan [29]. According to [28], concentrations of 2 and 5mg/ml of L-tryptophan seem to have different effects on the production of this phytohormone in different strains of *Pseudomonas* sp. and *Azotobacter* sp., 5mg/ml of L-tryptophan appeared favourable for IAA production.

As to IAA production, growth of *Streptomyces* sp. SF5 was optimal in the presence of 2mg/ml L-tryptophan, 5mg/ml and 7mg/ml seem to have adverse effects on bacterial growth.

Our results showed that a pH of 7 appeared favourable for the growth and the production of IAA. The acidic or basic pH are not suitable for IAA production because *Streptomyces* and other actinomycetes have slow growth under these conditions [30]. According to [31], some isolates of *Rhizobium* showed absence or slight production of IAA at pH=5, however, an optimum of production is observed at pH=7, and the production is decreased at pH=9. Growth of *Streptomyces* sp. SF5 is reduced by 1.46 times, (pH=5) and 2.40 times (pH=9). Production of IAA is reduced by 1.87 times (pH=5) and 2.65 times (pH=9). Based on these results, it is important to note that there is a close relationship between growth and IAA production. The pH affects the function of enzyme systems as well as the solubility of many substances that are important for bacterial growth. [32] Reported that the synthesis of high levels of IAA was determined in cultures with alkaline pH (7.5). It was found that growth and production

decreased in the sixth day. The production decrease is may be due to the release of degrading IAA enzymes, such as IAA oxidase and IAA peroxidase as has been shown in *Rhizobium* sp. isolated from *Cajanus cajan* [33].

Concerning temperature effect, it is noteworthy that a parallelism exists between growth and IAA production. It was observed that a temperature of 30°C was favourable for the two parameters studied. However, at 25°C there was no significant difference in growth of *Streptomyces* compared to that observed at 30°C. Growth of *Streptomyces* sp. SF5 and IAA production are decreased by 1.49 times and 2.08 times at 37°C respectively. [34] Have found that a temperature ranging from 25°C and 30°C was favourable for growth and production. *Streptomyces* CMU H009 produces a maximum of IAA when it grown at a temperature of 30°C [27]. *Streptomyces albidoflavus* showed a maximum of IAA production at 35°C and pH=7 [26]. [8] reported that some species of *Streptomyces* such as *S. purpurascens*, *S. coelicolor*, *S. olivaceus* and *S. kasugaensis* produce IAA with levels of 28.4, 21.8, 14.2 and 51.5 $\mu\text{g/ml}$ respectively under conditions of pH=7 and temperature of 35°C. In *Aspergillus niger* for example, a temperature of 25°C at pH=6 was optimal for AIA production. Furthermore, gibberellic acid was produced under conditions of pH = 5 and temperature of 30°C [35]. Addition of NaCl at different concentrations showed that growth of *Streptomyces* sp. SF5 was inhibited in the presence of increasing concentrations of NaCl, mainly at 500mM where its growth is reduced by factors of 1.77 (500mM) and 1.17 (300mM). According to [23], *Streptomyces* sp.MADO2 appeared more sensitive to salt stress mainly at 500mM compared to *Nocardioopsis* sp. MADO3 which showed an optimum growth at the same concentration. On the other hand, IAA production is reduced by 1.84 times, 1.74 times and 2.20 times respectively at 200, 300 and 500mM. There is little information on the effect of NaCl on the production of the AIA, those that exist in literature study the effects of pH, temperature, concentrations of L-tryptophan, the carbon and nitrogen sources...Salinity effect is very important to study mainly in saline soils where different cellular processes are inhibited by excessive NaCl concentrations such as growth, metabolism, nutrients uptake and photosynthesis [36]. Our results have showed the negative effect of NaCl on bacterial growth and IAA production and this

can affect and limit without doubt plant productivity.

REFERENCES

1. Küster E. The actinomycetes, pp 111-124. In: Burges A. & Raw F. (Eds), soil biology, Academic press, London, 1968.
2. Hagedorn C. Influences of soil activity on *Streptomyces* population inhabiting forest soils. *Appl Environ Microbiol* 32: 868-375, 1976
3. Williams ST, Davies FL. Use of antibiotics for selective isolation and enumeration of actinomycetes in soil. *J Gen Microbiol* 38: 251- 261, 1965
4. Pridham TG. Colour and streptomycetes Report of an international workshop on determination of colour of streptomycetes. *Appl Microbiol* 13: 43-61, 1965
5. Hoster F, Schmitz JE, Daniel R. Enrichment of chitinolytic microorganisms: isolation and characterization of chitinases exhibiting antifungal activity against phytopathogenic fungi from a novel *Streptomyces* strain. *Appl Microbiol Biotech* 66: 434-442, 2005
6. De Boer W, Folman LB, Summerbell RC *et al.* Living in a fungal world: impact of fungi on soil bacterial niche development. *FEMS Microbiol* 29: 795-811, 2005
7. Crawford DL, Lynch JM, Whipps JM *et al.* Isolation and characterization of actinomycete antagonists of a root fungal pathogen. *Appl Environ Microbiol* 59: 3899-3905, 1993
8. Matsukawa E, Nakagawa Y, Limura Y *et al.* Stimulatory effect of indole-3-acetic acid on aerial mycelium formation and antibiotic production in *Streptomyces* spp. *Actinomycetol* 21: 32-39, 2007
9. Stevenson II. Antibiotic activity of actinomycetes in soil and their controlling effects on root-rot of wheat. *J Gen Microbiol* 14: 440-448, 1956
10. Keyeo F, Noor Ai'shah O, Amir HG. The effects of nitrogen fixation activity and phytohormones production of diazotroph in promoting growth of rice seedlings. *Biotech* 10: 1-7, 2011
11. Vijayakumar R, Muthukumar C, Thajuddin N *et al.* Studies in the diversity of actinomycetes in Palk Strait region of Bay of Bengal, India. *Actinomycetol* 21: 59- 65, 2007
12. Lemriss S, Laurent F, Couble A *et al.* Screening of nonpolyenic antifungal metabolites produced by clinical isolates of actinomycetes. *Can J Microbiol* 49: 669-674, 2003
13. Bano N, Musarrat J. Characterization of a new *Pseudomonas aeruginosa* strain NJ-15 as a potential biocontrol agent. *Current Microbiol* 46: 324-328, 2003
14. Baskaran R, Vijayakumar R, Mohan PM. Enrichment method for the isolation of bioactive actinomycetes from Mangrove sediments of Andaman Islands, India. *Malaysian J Microbiol* 07: 26-32, 2011
15. Pisano M, Sommer MJ, Lopez MM. Application of pretreatment for the isolation of bioactive actinomycetes from marine sediments. *Appl Microbiol Biotech* 25: 285- 288, 1986
16. Porter JN, Wilhelm JJ, Tresner HD. Method for the preferential isolation of actinomycetes from soil *Appl Microbiol* 08: 174, 1960
17. Petrosyan P, Garcia-Varela M, Luz-Madrigal A *et al.* *Streptomyces mexicanus* sp. Nov., a xylanolytic microorganism isolated from soil. *Int J Sys Microbiol* 53: 269-273, 2003.
18. Holt JG, Krieg NR, Sneath PHA *et al.* *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* Baltimore: Williams & Wilkins. 1994.
19. Locci R. *Streptomyces* and related genera. In: William S.T. Hot J.G. (Eds), *Bergey's manual of systematic bacteriology* Williams and Wilkins, Baltimore. pp. 2451-2491, 1989
20. Hayakawa M, Nonomura H. A new method for the intensive isolation of actinomycetes from soil. *Actinomycetol* 03: 95- 104, 1989.
21. da Silva Sousa C, Fermino Soares AC, da Silva Garrido M. Characterization of streptomycetes with potential to promote plant growth and biocontrol. *Sci Agric. (Piracicaba, Braz.)* 65: 50-55, 2008.
22. Pinet JM, Demain AL. Actinomycetes in biotechnology. An overview. In: Goodfellow M, Williams ST, Mordarski M (eds). London, Academic Press; 1988, pp 461-482.

23. Ameer H, Ghoul M, Selvin J. The osmoprotective effect of some organic solutes on *Streptomyces* sp. MADO2 and *Nocardiosis* sp. MADO3 growth. Braz J Microbiol 42: 543-553, 2011.
24. Ghosh S, Basu PS. Production and metabolism of indole acetic acid in roots and root nodules of *Phaseolus mungo*. Microbiol Res 161: 362-366, 2006.
25. Loper JE, Schroth MN. Influence of bacterial source of indole-3-acetic acid of root elongation on sugar beet. Phytopathol 76: 386-389, 1986.
26. Narayana KJP, Prabhakar P, Vijayalakshmi MP *et al.* Biological activity of phenylpropionic acid from a terrestrial Streptomyces. Polish J Microbio. 56: 191-197, 2007.
27. Khamna S, Yokota A, Peberdy JF *et al.* Indole-3-acetic acid production by *Streptomyces* sp. isolated from some Thai medicinal plant rhizosphere soils. Eurasian J Biosciences 04: 23-32. 2010.
28. Ahmad F, Ahmad I, Khan MS. Indole acetic acid production by the indigenous isolates of *Azotobacter* and fluorescent *Pseudomonas* in the presence and absence of tryptophan. Turk J Biol 29: 29-34, 2005.
29. Sridevi M, Mallaiiah KV. Production of indole-3-acetic acid by *Rhizobium* isolates from *Sebania* species. Plant Sci Res 01: 13-16, 2008.
30. Shirokikh IG, Zenova GM, Merzaeva OV *et al.* Actinomycetes in prokaryotic complex of the rhizosphere of oats in a soddy-podzolic soil. Eurasian soil Sci 40: 158-162, 2007.
31. Sahasrabudhe MM. Screening of rhizobia for indole acetic acid production. Anal Biol Res 02:460-468, 2011.
32. Yurekli F, Geckil H, Topcuoglu F. The synthesis of indole-3-acetic acid by the industrially important white-rot fungus *Lentinus sajor-caju* under different culture conditions. Mycol Res 107: 305-309, 2003.
33. Datta C, Basu PS. Indole acetic acid production by a *Rhizobium* species from root nodules of a leguminous shrub *Cajanus cajan*. Microbiol Res 155: 123-127, 2000.
34. Aldesuquy HS, Mansour FA, Abo-Hamed SA. Effect of culture filtrates of *Streptomyces* on growth and productivity of wheat plants. Folia Microbiologica 43: 465-470, 1998.
35. Bilkay IS, Karakoç Aksöz SN. Indole-3-acetic acid production in *Aspergillus niger*. Tur. J Biol 34: 313-318, 2010.
36. Ayala-Astorga GI, Alcaraz-Meléndez L. Salinity effects on protein content, lipid peroxydation, pigments and proline in *Paulownia imperialis* (Siebols&zuccarini) and *Paulownia fortunei* (seemann & hemsley) grown in vitro. Electron J Biotechnol 13: 1-15, 2010.

Full Length Research Paper

Effect of salinity stress, *Streptomyces* sp. SF5 and *Salsola vermiculata* on germination of *Triticum durum* L.

Hanane Ameer^{*}, Mostefa Ghoul

Laboratory of applied microbiology, Faculty of natural science and life, University of Ferhat Abbas-Sétif-1, Algeria.

Accepted 10 December, 2013

Exposure of wheat (*Triticum durum* L.) to NaCl (100 and 200 mM) showed that this variety is moderately halo tolerant. Germination rates in the absence and presence of salt (100 and 200 mM) are respectively 98.3, 83.3 and 53.3%. The supply of *Salsola vermiculata* and the combination between this halophyte and *Streptomyces* sp. SF5 affected germination significantly. Germination rates in the absence and presence of 100 and 200 mM of NaCl are respectively 86.65, 55, 48.3% (*Salsola* alone), 66.65, 53.3 and 36.65% (*Salsola*+ *Streptomyces* sp). The lengths of roots and steams are also inhibited by salinity. Roots and steams lengths are reduced by factors of 2.12 and 5.51 at 100 mM, the reduction is more pronounced at 200 mM, reduction factors are respectively 5.96 and 10.89. *Streptomyces* sp.SF5 appears very efficient in improving germination rates, they are respectively 85 and 68.3% (100 and 200 mM) compared to the controls. The improvement factors of the lengths of roots and steams are respectively 1.10, 1.17, 1.81, 1.02, 1.11 and 2.29.

Key words: Salinity stress, germination, *Salsola vermiculata*, *Streptomyces* sp. SF5, roots and steams lengths.

INTRODUCTION

Abiotic stresses such as salinity and drying are among the factors affecting plant growth. Salinity is considered as the major factor limiting crop yields in arid and semi-arid (Abdel-Hady, 2006). In plants, salt stress can affect many physiological processes such as development and germination (Zaki and Radwan, 2011). Moreover, salinity reduced significantly lengths and fresh and dry weight of shoots and roots (Jamil et al., 2006), it disrupts photosynthesis (Gobinathan et al., 2009) and certain enzyme activities (Al-Mansouri et al., 1999).

Halophytes are plants which can grow in environments where degree of salinity is very high (Flowers et al., 1986). They accumulate osmoprotectants to adapt to osmotic stress (Denden et al., 2005). Phytohormones such as indole acetic acid (IAA) are known as regulators of plant growth, they are also included in the response to salt stress (Kumar et al., 2011).

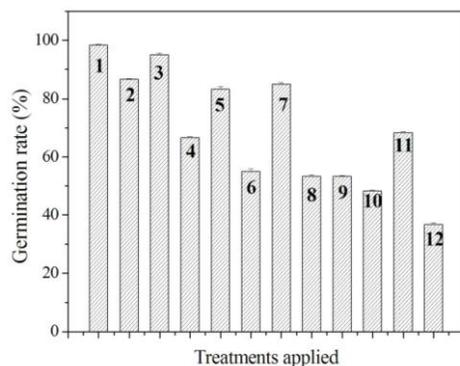
Wheat occupies an important place among all cereals (Khan et al., 2009), however its production is largely affected by salinity (Abdel-Hady, 2006). The aim of our study is to analyze the effect of NaCl (100 and 200 mM) on the growth of durum wheat (*Triticum durum* L.).

The effect of addition of the halophyte, *S. vermiculata* (*Chenopodiaceae*) known for its ability to accumulate glycine betaine as major-onium compound (Popp, 1995) and *Streptomyces* sp. SF5 which is a moderately halophilic bacteria endowed with the capacity to produce IAA (Ameer and Ghoul, 2012) is also examined. Furthermore, this study leads to analysis of the impact of combination of *S. vermiculata* and *Streptomyces* sp. SF5 on the growth of *Triticum durum* L.

MATERIALS AND METHODS

This study was conducted through a variety of durum wheat named Mohamed Ben Bachir (MBB) which is a local selection from CETO Setif (Algeria) obtained by the

Corresponding author: E-mail: ameur_han@yahoo.fr.



- 1: Control, 2: Control + *S. vermiculata*, 3: Control +*Streptomyces* sp.SF5,
 4: Control +*S.vermiculata*+*Streptomyces* sp. SF5, 5: 100 mM, 6: 100 mM+*S.vermiculata*
 7: 100mM+*Streptomyces*.sp.SF5, 8: 100mM+*S.vermiculata*+ *Streptomyces* sp. SF5
 9: 200mM, 10: 200mM+*S.vermiculata*, .11: 200mM+*Streptomyces*.sp.SF5
 12: 200mM+*S.vermiculata*+ *Streptomyces* sp.SF5

Figure 1. Germination rates of *T. durum* L. in the presence of the different treatments.

National Centre for Control and Certification of seeds and plants. The objective is to study the effect of NaCl, *Streptomyces* sp. SF5 and halophyte extract on germination of *T. durum* L.

Seeds germination study

Filter paper previously sterilized at 180°C was placed in sterile petri dishes. Then, the seeds were sterilized by sodium hypochlorite for 5 min and washed with distilled water. The seeds of the same size were selected and then they were placed in petri dishes (20 seeds in each petri dish). The petri dishes were irrigated daily with of 3 ml of saline solution (100 and 200 mM). Controls (NaCl/0mM) were irrigated with distilled water. The test consists of twelve treatments carried out in three repetitions. The solutions were added or not of aqueous extracts of *Salsola vermiculata* and /or *Streptomyces* sp. SF5. They are incubated at 20°C for 15 days.

Preparation of halophyte aqueous extract

S. vermiculata was rinsed with distilled water, dried and ground. It is then sterilized at 110°C for 30 min to be used at a concentration of 2%.

Preparation of the inoculum

5 ml of ISP2 medium (g/l) (yeast extract 4, malt extract 10, glucose 10, distilled water 1 l) were inoculated from fresh cultures of *Streptomyces* sp. SF5. After incubation

at 30°C for 72 h, the bacterial suspensions were centrifuged at 3000 rpm for 15 min and washed with 0.9% NaCl solution. The inoculum contained 4×10^7 cfu/ml.

Estimation of kinetic germination

Germination kinetic is determined by counting every two days the number of germinated seeds. The lengths of the stems and roots of the different treatments are also determined. The seeds are considered germinated if the length of root and coleoptiles are between 2 and 3 mm.

RESULTS

Effect of NaCl on *T. durum* L. germination

Seed germination is influenced by treatment; it is either inhibited or enhanced. In presence of 200 mM NaCl, the inhibitory effect of NaCl (53.3%) is more obvious compared to treatments 1 and 5 (98.3 and 83.3%). It is more pronounced in treatments 4, 8 and 12 (66.65, 53.3 and 36.65%). *Streptomyces* Sp. SF5 enhances germination rates in all treatments with and without NaCl (Figure 1).

Kinetics of germination

Seed germination of wheat is followed every two days for all samples in order to analyze the variation and the influence of each treatment on the number of germinated

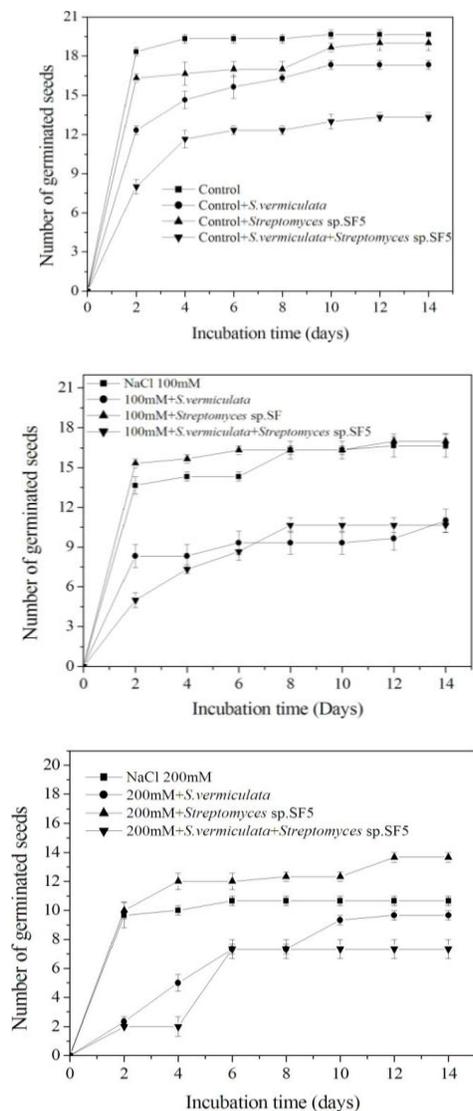


Figure 2. Effect of NaCl (0, 100 and 200mM), *S.vermiculata*, *Streptomyces* sp. SF5 and *S.vermiculata*+ *Streptomyces* sp. SF5 on the number of germinated seeds of *T. durum* L.

seeds. In absence of salt stress, the germination was maximum in treatment 1. In presence of NaCl, the number of germinated seeds decreases but the decrease is more pronounced at 200 mM. The supply of halophyte extract and the combination of halophyte and bacterial strain reduced the number of germinated seeds compared to treatments with and without NaCl (Figure 2).

Effect on roots lengths

Roots length was maximum in treatment 3 (Control + *Streptomyces* sp.SF5) followed by treatment 1 (Control) (Figure 3).

Evolution of roots lengths

Roots lengths increase continuously in treatments 1 and 3 in the presence of NaCl (100 mM and 200) and/or *Streptomyces* sp. SF5. However, for all treatments with and without NaCl, the extract of *S. vermiculata* alone or in combination with the bacterial strain inhibited strongly inhibition roots lengths (Figure 4).

Effect on steams lengths

The steam length is also affected by NaCl and by adding the halophyte extract. The inhibitory effect was also

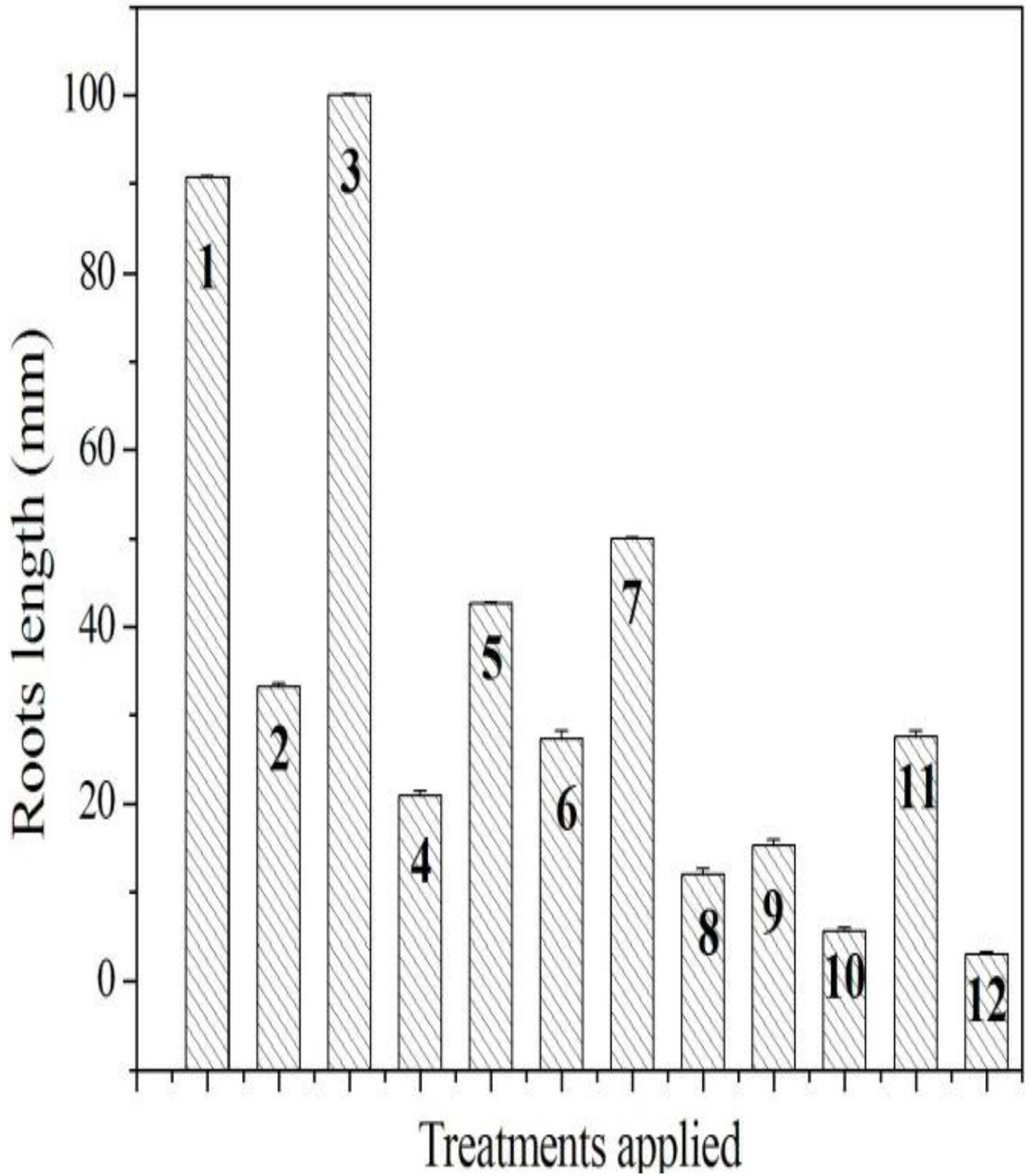


Figure 3. Roots lengths of *T. durum* L. in the presence of the different treatments.

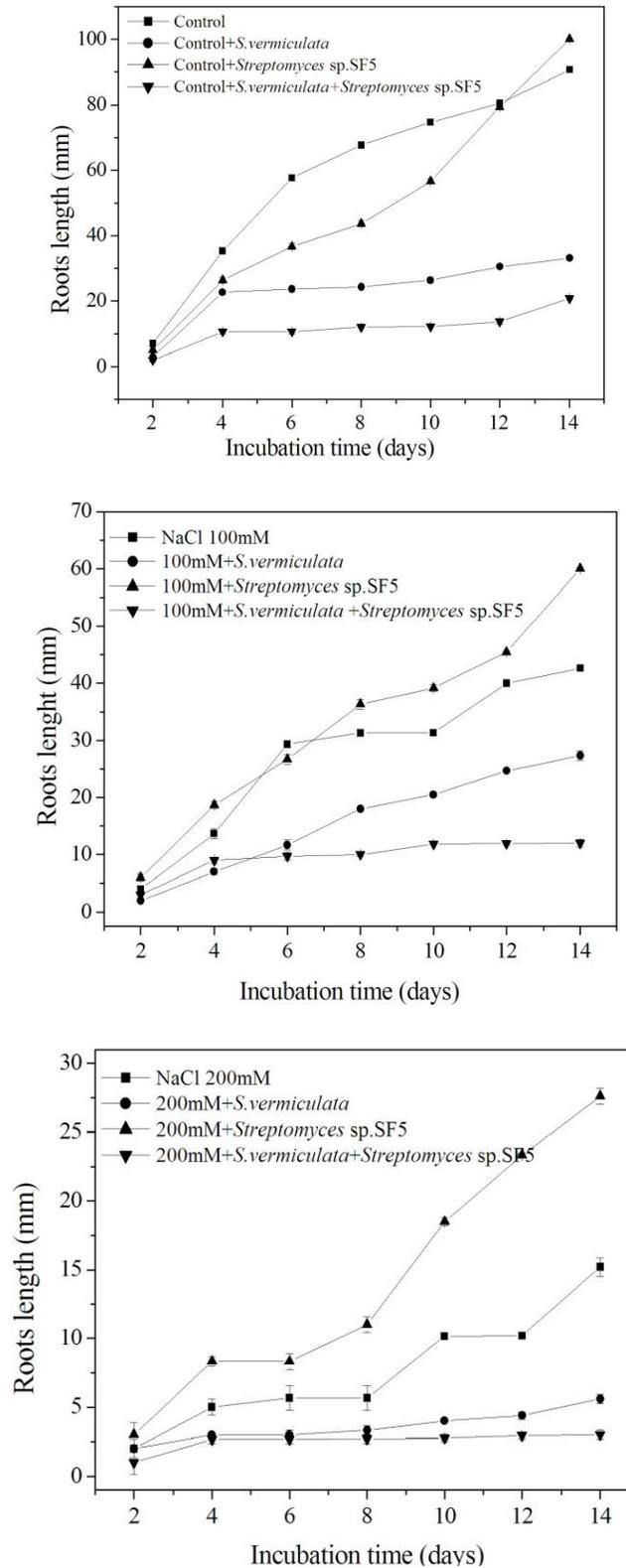


Figure 4. Effect of NaCl (0,100 and 200 mM), *S. vermiculata*, *Streptomyces* sp. SF5 and *S. vermiculata* +*Streptomyces* sp.SF5 on the roots lengths of *T. durum* L.

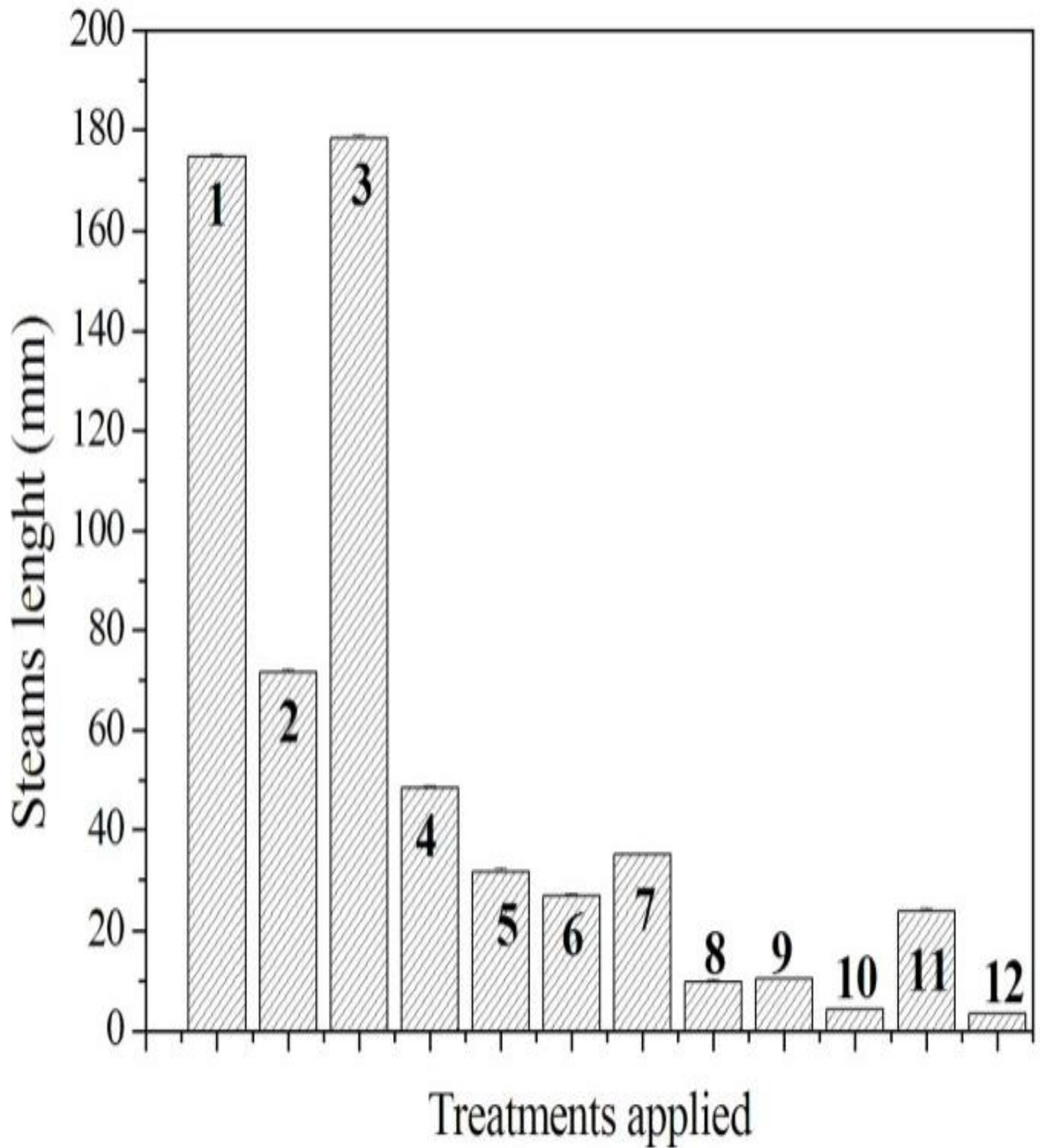


Figure 5. Steams lengths of *T. durum* L. in the presence of the different treatments.

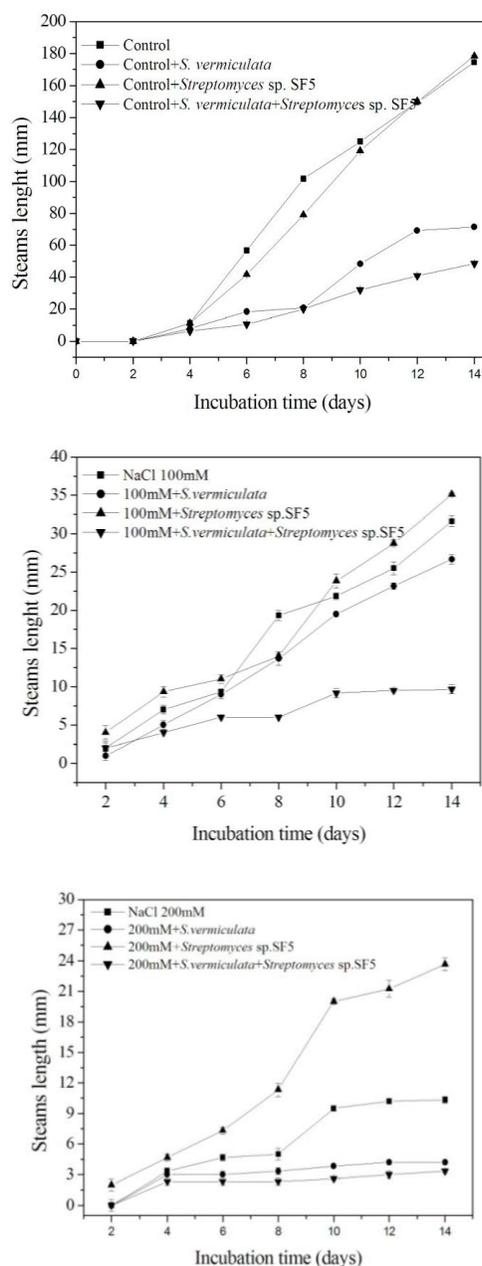


Figure 6. Effect of NaCl (0,100 and 200 mM), *S. vermiculata*, *Streptomyces* sp. SF5 and *S. vermiculata* +*Streptomyces* sp.SF5 on the steams lengths of *T. durum* L.

observed in treatments 4, 8 and 12 (NaCl, 0, 100 and 200 mM + *S. vermiculata* +*Streptomyces* sp.SF5) (Figure 5).

Evolution of steams lengths

Steams lengths increase very slightly in the samples with and without NaCl. The inhibitory effect is more pronounced in treatments added of halophyte extract and combined of *Streptomyces* (Figure 6).

Discussion

It is well established that salt stress affects and limits the plant growth namely germination, root and steams length and fresh and dry weight of plants. Salinity has three potential effects on plants: reduction of water activity, specific ion toxicity (sodium and chlorine) and interference with the availability of essential nutrients (Carpici et al., 2010). Our results showed that each

treatment applied has a different effect on seed germination of *T. durum* L. Germination rates are calculated to analyze and compare these effects and the influence of these treatments on germination. Determination of rates germination is one of the methods which is widely used in the study of halo tolerance of plants (Dantas et al., 2005).

In absence of NaCl, the number of germinated seeds is more important in treatment 1 (control) followed by treatment 3 (control + *Streptomyces* sp.SF5). Germination rates are respectively 98.3 and 95%. Many studies of germination under salt stress suggests that the seeds of most plant species reach a maximum of germination in distilled water (Ghoulam and Fares, 2001; Alatar, 2011).

In presence of 100 mM NaCl, a non significant reduction in the number of germinated seeds was observed (83.3%). Wheat is generally considered moderately salt tolerant (Hamza, 1967) compared to barley (Maas, 1993) and triticale (Touraine and Ammar, 1985). In addition, it has been shown that salinity delays germination for many plant species, but does not reduce significantly the rate of germination (Ayers and Westcot, 1985). Nitric oxide (NO), polyamines, diamine oxidase and polyamine oxidase play very important roles in various physiological processes in plants, such as germination, root development, flowering and in response to abiotic stress conditions (Wimalasekera et al., 2011). Accumulation of some osmolytes such as proline can protect enzymes and macromolecules of the deleterious effects of NaCl (Mateo et al., 2004). According to Vendruscolo et al. (2007) and Shafi et al. (2011), high concentrations of proline are accumulated in wheat grown under conditions of water stress. The synthesis of proline is an adaptive strategy taken by plants and its content is correlated with their tolerance of NaCl (Driouch et al., 2001). Salt did not reduce only germination but it delays it, this is due to alteration of hormones and enzymes contained in the seed (Botia et al., 1998).

In presence of 200 mM NaCl, the inhibitory effect of NaCl (53.3%) is more obvious compared to the control (98.3%). The decrease in germination rate is due to an osmotic dormancy process developed in stress conditions. Furthermore, salt delays also affect germination, this delay may be due to alteration of hormones and enzymes that are found in the seed (Botia et al., 1998). The most important enzyme involved in the process of germination is α -amylase, its action is influenced by salt stress by destroying its structure (Saboury and Karbassi, 2000). In *Abelmoschus esculentus* L. for example, germination is reduced by 20% in the presence of high salt concentrations (Ben Dkhil and Denden, 2010). It appears that a decrease in germination is related to salinity which causes an imbalance of metabolic processes leading to the formation of phenolic compounds (Ayaz et al., 2000).

NaCl has certainly inhibited seed germination mainly at 200 mM. However, it should be noted that the inhibitory effect is more severe in the presence of *S. vermiculata*. According to our results, germination rates in absence and in presence of 100 mM and 200 mM of NaCl are respectively 86.65%, 55% and 48.3% compared to the control (98.3%), treatment 5 (83.3%) and treatment 9 (53.3%). Some halophytes synthesize cytotoxic alkaloids (Wu et al., 1997) and phenolic compounds known for their ability to precipitate proteins (Zhu et al., 1997). Phenolic compounds affect respiration, oxidative phosphorylation and the metabolism of plants (Demos et al., 1975). Some phenolic compounds in particular monomeric phenolic acids are toxic in plants and some microorganisms at concentrations of 10^{-4} and 10^{-5} M (Whitehead et al., 1982). Phenolic compounds have been grouped as inhibitors of plant growth (Sharma et al., 1986), tannic acid, gentisic acid and P-coumaric acid inhibit the growth of *Phaseolus aureus* L. coleoptile (Demos et al., 1975).

Combination of *S. vermiculata* and *Streptomyces* sp. SF5 affects germination greatly compared to other treatments. However, the effect is more pronounced in the presence of NaCl. Germination rates in absence and presence of NaCl (100 and 200 mM) are respectively, 66.65, 53.3 and 36.65%. Phenolic compounds are considered as inhibitors of the growth of plants, they act as antagonists of other inhibitors such as abscisic acid, which is considered as a very potent inhibitor of the growth of *Amaranthus caudatus*. The interaction between these two inhibitors plays a regulating role in plant growth and restores normal growth (Ray et al., 1980). Combination of abscisic acid with some phenolic compounds such as salicylic acid, cinnamic acid and ferulic acid had the same inhibitory effect. Abscisic acid inhibits amylase activity of *T. aestivum* L. and interaction with phenolic compounds reverses the inhibitory effect of abscisic acid and regulates seed germination (Sharma et al., 1986).

It is noteworthy that the inhibitory effect of combination of *Streptomyces* sp. SF5 and *Salsola vermiculata* on seed germination of *T. durum* L is due to an antagonist effect. *Streptomyces* sp. accumulates indole acetic acid (Ameur and Ghoul, 2012), phytohormone that enhances plant growth and phenolic compounds may accumulated by the halophyte, had a reverse effect of the stimulatory action of AIA, and therefore, inhibition of seed germination is observed. In *Amaranthus caudatus*, the antagonist action of phenolic stimulates (abscisic acid) or inhibits (gibberellic acid, a plant hormone) plant growth (Ray and Laloraya, 1984).

Only supply of *Streptomyces* sp.SF5 has improved germination. The stimulatory effect is more obvious in the presence of NaCl (200 mM). Germination rates in the presence of 100 mM and 200 are respectively 85 and 68.3% compared to treatment 5 (83.3%) and treatment 9

(53.3%), germination was improved respectively by 1.2 and 1.28 times. The literature concerning the potential effect of plant-associated bacteria is extremely rich (Zaki and Radwan, 2011). These bacteria simulate plant growth by increasing availability of nitrogen, synthesis of phytohormones (auxins and cytokinins) and solubilization of minerals (Bowen and Rovira, 1999). Germination of various plant species can be improved in normal or stress conditions by providing phytohormones (Ashraf and Foolad, 2005). Several studies have shown that the application of plant growth substances such as auxins and gibberellins can increase the capacity of germination in many plant species (Balestri and Bertini, 2003).

Actinomycetes are involved in the improvement of plant growth by production of phytohormones such as auxin and gibberellin. Indole acetic acid is the principal form of auxin responsible of the regulation of many cellular processes such as cell division, elongation and differentiation (Hussein et al., 2011). It stimulates also the proliferation and roots development which increases the ability to absorb water and nutrients (Ashrafuzzaman et al., 2009). Indole acetic acid is included in the induction of the stress response in plants. This phytohormone modulates expression of antioxidant enzymes and increases oxidative and salt stress tolerance (Pedranzani et al., 2003). Application of indole acetic acid in wheat (*T. aestivum* L.) minimizes the adverse effects of heavy metals that are contained in water (Kumar et al., 2011). Roots and steams lengths are the most important parameters in the study of plant response to salt stress because roots absorb water and other elements, and steams distribute them in the rest of plant (Jamil and Rha, 2004). Our results showed that the lengths of roots and steams are also affected by salinity, the effect is more pronounced at 200 mM NaCl. Roots length is reduced by 2.12 and 5.96 times respectively at 100 and 200 mM of NaCl. Reduction in the development of roots and steams is due to the toxic effects of high concentrations of NaCl and the imbalance in the availability of nutrients (Datta et al., 2009).

In presence of *S. vermiculata*, steams length is significantly reduced compared to roots length. Reduction factors are respectively 2.44, 6.54 and 41.54 times for treatments 2, 6 and 10 compared to treatment 1. Reduction factors of roots length are respectively 2.73, 3.31 and 16.18 times. In absence of NaCl, coleoptiles and root length in two varieties of *T. aestivum* L. are respectively 24.07 and 37.36 mm. In presence of NaCl, the lengths are reduced respectively by 67.73 and 34.45% (Maghsoudi and Maghsoudi, 2008).

The inhibitory effect of addition of the halophyte is well observed, it accumulates some toxic compounds which inhibit *T. durum* L growth. The antagonistic effect of *S. vermiculata* and indole acetic acid synthesized by *Streptomyces* sp. SF5 is also evident on roots and steams length. Roots length is reduced by factors of 4.35,

7.58 and 30 times for treatments 4, 8 and 12 compared to the control. Steams length is decreased respectively by factors of 3.61, 18.06 and 52.4 times.

Streptomyces sp. SF5 stimulates strongly root and steam length. IAA accelerates the emergence of roots and increases root growth, it also helps to improve length and dry weight of the coleoptiles (Akbari et al., 2007). The length of roots and steams are improved respectively by factors of 1.10, 1.17, 1.81 times, 1.02, 1.11 and 2.29 times for treatments 3, 7 and 11. Indole acetic acid increases the rate of germination and elongation of the coleoptile (Rekoslavskaya et al., 1999). *Streptomyces* sp. SF5 applied alone showed a power osmoprotection of *T. durum* L. and combination with *S. vermiculata* revealed an antagonistic effect and affects negatively germination, the inhibitory effect exceeds the inhibitory effect of NaCl.

Conclusion

It is important to confirm the inhibitory effect of NaCl mainly at 200 mM on germination of *T. durum* L. and its restoration by *Streptomyces* sp. SF5. In the other hand, combination of *S. vermiculata* and *Streptomyces* sp. inhibit strongly germination of durum wheat compared to the negative action of NaCl and the application of *S. vermiculata* alone.

REFERENCES

- Abdel-Hady MS (2006). In vitro prediction for salt tolerance in wheat. The 2nd international Conf on water resources and arid environment, p.1-10.
- Akbari G, Modarress Sanavy SAM, Yousefzadeh S (2007). Effect of auxin and salt stress (NaCl) on seed germination of wheat cultivars (*Triticum aestivum* L.). Pak. J. Biol. Sci., 10 (15): 2557-2561.
- Alatar AA (2011). Effect of temperature and salinity on germination of *Achillea fragrantissima* and *Moringa peregrina* from Saudi Arabia. Afr. J. Biotechnol., 10 (17): 3393-3398.
- Al-Mansouri M, Kinet JM, Lutts S (1999). Compared effect of sudden progressive impositions of salt stress in three durum wheat (*Triticum durum* Desf.) cultivars. J. Plant Physiol., 154: 743-752.
- Ameur H, Ghoul M (2012). Screening of Actinomycetes Producing Antibacterial Substances and Indole Acetic Acid (IAA) and Optimization of Growth and IAA Production Conditions in *Streptomyces* sp. SF5. Int. J. Pharm. Biol. Archives. 3(3): 545-551
- Ashrafuzzaman M, Farid AH, Ismail MR, Hoque MA, Islam MZ, Shahidullah SM, Sariah M (2009). Efficiency of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) of the enhancement of rice growth. Afr. J. Biotech., 8: 1247-1252.
- Ayaz FA, Kadioglu A, Turgut R (2000). Water stress affects on the content of low molecular weight carbohydrates and phenolic acids in *Ctenanthe setosa* (Rose.) Eichler. Can. J. Plant. Sci., 80: 373-378.
- Ayers R, Westcot W (1985). Water quality for agriculture. Irrigation and Drainage. Paper N° 29, FAO. Rome.
- Balestri E, Bertini S (2003). Growth and development of *Posidonia oceanica* seedlings treated with plant growth regulators: possible implications for meadow restoration. Aqua. Bot., 76: 291-297.
- Ben Dkhil B, Denden M (2010). Salt stress induced changes in germination, sugars, starch and enzyme of carbohydrate metabolism in *Abelmoschus esculents* L. (Moench) seeds. Afr. J. Agric. Res., 05 (12): 1412-1418.
- Botia P, Carvajal M, Cerda A, Martinez V (1998). Response of eight

- Cucumis melo cultivars to salinity during germination and early vegetative growth. *Agron.*, 18: 503-513.
- Bowen GD, Rovira AD (1999). The rhizosphere and its management to improve plant growth. *Adv. Agron.*, 66: 1-102.
- Carpici EB, Clik N, Bayram G, Asik BB (2010). The effects of salt stress on the growth, biochemical parameter and mineral element content of some maize (*Zea mays* L.) cultivars. *Afr. J. Biotechnol.*, 9 (41): 6937-6942.
- Dantas BF, Ribeiro LDS, Aragao CA (2005). Physiological response of cowpea seeds to salinity stress. *Rev. Bras. Sementes.* 27: 144-148.
- Datta JK, Nag S, Banerjee A, Mondal NK (2009). Impact of salt stress on five varieties of wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars under laboratory condition. 13 (3): 93-97.
- Demos EK, Woolwine M, Wilson RH, McMillan C (1975). The effects of ten phenolic compounds on hypocotyl growth and mitochondrial metabolism of mung bean. *Am. J. Bot.*, 62 (1): 97-102.
- Denden M, Benttai T, Salhi A, Mathlouthi M (2005). Effect of salinity on chlorophyll fluorescence, proline content and floral production in three ornamental species. *Tropicultura.* 23(4): 220-225.
- Drriouch A, Ouhssine M, Ouassou A, Ben Gaddour R (2001). Effet of NaCl on PEPc foliar activity and its role on malate and proline synthesis in durum wheat (*Triticum durum* Desf.) *Sci. Let.*, 3 (3): 20-25.
- Flowers TJ, Hajibagueri MA, Clipson NJW (1986). Halophytes. *Quarterly Rev. Biol.*, 61: 167-171.
- Ghoulam C, Fares K (2001). Effect of salinity on seed germination and early seedling growth of sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Seed Sci. Technol.*, 29: 357-364.
- Gobinathan P, Sankar B, Murali PV, Panneerselvam RN (2009). Effect of calcium chloride on salinity-induced oxidative stress in *Pennisetum typoides*. *Bot. Res. Int.*, 2 (3): 143-148.
- Hamza M (1967). Influence of divers sodium chloride concentrations on the growth of young plants of *Triticum aestivum*. *C. R. Acad. Sci. Paris.* 176: 1997-2000.
- Hussein K, Hussein M, Nawaz Majeed A, Bhatti KH (2011). Morphological response of chaksu (*Cassia absus* L.) to different concentrations of indole acetic acid (IAA). *Pak. J. Bot.*, 43 (3): 1491-1493.
- Jamil M, Rha ES (2004). The effect of salinity (NaCl) on the germination and seedling of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) and Cabbage (*Brassica oleracea capitata* L.). *Korean J. Plant Res.* 07: 226-232.
- Jamil M, Lee DO, Kwang Yong Jung KY, Ashraf M, Lee SC, Rha ES (2006). Effect of salt (NaCl) stress on germination and early seedling growth of four vegetables species. *J. Central Eur. Agric.*, 7 (2): 273-282.
- Khan MA, Shirazi MU, Dali Khan M, Mujtaba SM, Islam E, Mumtaz S, Shereen A, Ansari RU, Yasin Ashraf M (2009). Role of proline, K/Na ratio and chlorophyll content in salt tolerance of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Pak. J. Bot.* 41(2): 633-638.
- Kumar CS, Singh A, Sagar PK, Maurya JN (2011). Effect of indole acetic acid on wheat (*T. aestivum* L.) irrigated with sewage water. *J. Physiol.*, 3 (8): 08-11.
- Maas EV (1993). Salinity and citriculture. *Tree Physiol.*, 12: 195-216.
- Maghsoudi AM, Maghsoudi K (2008). Salt stress effects on respiration and growth of germinated seeds of different wheat (*T. aestivum* L.) cultivars. *W. J. Agric. Sci.*, 4 (3): 351-358.
- Mateo A, Muhlenbock P, Rusterucc C, Chang CC, Miszalski Z, Karpinska B, Parker JE, Mullineaux PM, Karpinski . (2004). Lesion stimulating disease 1 is required for acclimation to conditions that promote excess excitation energy. *Plant Physiol.*, 136: 2818-2830.
- Pedranzani H, Racogni G, Alemanon S, Miersch O, Ramirez I, Pena-Cortes H, Taleisnik E, Machoda-Domenech E, Abdala G (2003). Salt tolerant tomato plants show increased levels of jasmonic acid. *Plant Growth Regulation.* 41: 149-158.
- Popp M (1995). Salt resistance in herbaceous halophytes and mangroves. *Pro. Bot.*, 56: 416-429.
- Ray SD, Guruprasad KN, Laloraya MM (1980). Antagonistic effect of phenolic compounds on abscisic acid-induced inhibition of hypocotyl growth. *J. Exp. Bot.* 31 (6): 1651-1656.
- Ray SD, Laloraya MM (1984). Interaction of gibberellic acid, abscisic acid, and phenolic compounds in the control of hypocotyls growth of *Amaranthus caudatus* seedlings. *Revue canadienne de botanique.* 62 (10): 2047-2052.
- Rekoslavskayal NI, Yurjeval OV, Salyaev RK, Mapelli S, Kopytinal TV (1999). D-tryptophan as IAA source during wheat germination. *Plant Physiol.*, 25: 39-49.
- Saboury AA, Karbassi F (2000). Thermodynamic studies on the interaction of calcium ion with alpha-amylase-thermochemical. *Actinomycetol.*, 362: 121-129.
- Shafi M, Bakht J, Javed Khan M, Aman Khan M, Raziuddin A (2011). Role of abscisic acid and proline in salinity tolerance of wheat genotypes. *Pak. J. Bot.* 43 (2): 1111-1118.
- Sharma S, Sharma SS, Rai VK (1986). Reversal of phenolic compounds of abscisic acid-induced inhibition of *in vitro* activity of amylase from seed of *T. aestivum* L. *New Phytol.* 103 (2): 293-297.
- Touraine B, Ammar M (1985). Comparative study of the salt sensibility of a triticale and barley. *Agrono.*, 5: 391-395.
- Vendruscolo ACG, Schuster I, Pillegi M, Scapim CA, Molinari HBC, Marur CJ, Vieira LGC (2007). Stress-induced synthesis of proline confers tolerance to water deficit in transgenic wheat. *J. Plant. Physiol.*, 164 (10): 1367-1370.
- Wimalasekera R, Tebartz F, Scherer GFE (2011). Polyamines, polyamine oxidases and nitric oxide in development; abiotic and biotic stresses. *Plant Sci.*, 181(5): 593-603.
- Whitehead DC, Dibb H, Hartley RD (1982). Phenolic compounds in soil as influenced the growth of different plant species. *J. Appl. Ecol.*, 19: 579-588.
- Wu QL, Wang SP, Tu GZ, Feng YX, Yang JS (1997). Alkaloids from *Piper purberullum*. *Phytochem.*, 44: 727-730.
- Zaki RN, Radwan TEE (2011). Improving wheat grain yield and its quality under salinity conditions at a newly reclaimed soil by using different organic sources as soil or foliar applications. *J. Appl. Sci. Res.*, 7(1): 42-55.
- Zhu M, Phillipson JD, Greengrass PM, Bower NE, Cai Y (1997). Plant polyphenols: biologically active compounds for non-selective binders to protein. *Phytochem.* 44: 441-447.

ملخص: تم عزل سبع سلالات من البكتيريا الخيطية من تربة خصبة بمنطقة الأوريسيا (شمال سطيف). السلالتان SF5 و MADO3 *Nocardiopsis* sp. تنتجان كميات معتبرة من أندول حمض الخل 55.58 و 39.38 $\mu\text{g/ml}$ على التوالي. تبين أن السلالتين لهما فعالية ضد بعض البكتيريا و الفطريات وذلك إلى جانب *Streptomyces* sp. MADO2. مستعمرات *Streptomyces* يمكن تمييزها بلمسها الخشن و لا يمكن نزعها بسهولة من وسط الزرع و لها رائحة ترابية. بناء على الخصائص الزراعية و المرفولوجية يمكن تقريباها إلى نوع *Streptomyces*. السلالات الثلاثة محبة لملوحة معتدلة، و يختلف سلوكها اتجاه الإجهاد الملحي تبعاً لدرجة الملوحة و نوع وسط الزرع. *tréhalose* و *proline* و *glycine bétaine* هي ذات فعالية كبيرة في الوقاية من الضغط الأسموزي لكل من *Nocardiopsis* sp. و *Streptomyces* sp. في تراكيز عالية الملوحة بينما في تراكيز منخفضة الملوحة فهي تؤثر سلباً على النمو. *Salsola vermiculata* تقي من الملوحة العالية و بفعالية كبيرة لكل من *Streptomyces* sp. MADO2 و *Streptomyces* sp. SF5. الانتاش، الأطوال و الوزن الجاف للجذور و السيقان وكذا نسب الكلوروفيل و الكاروتينويد تأثرت سلباً خصوصاً في درجة ملوحة 200 mM بالنسبة لـ *Triticum durum* L. التثبيط كان حاداً في وجود *Salsola vermiculata* و *Streptomyces* sp. معاً. نسب الانتاش في درجة ملوحة 100 و 200 mM كانت على التوالي: 46.66% و 40% و 26.6% . إضافة *Salsola vermiculata* أو *Streptomyces* sp. كل حدى له تأثير فعال على انتاش و نمو *Triticum durum* L. نسب الانتاش كانت على التوالي 86.6% (100 mM) و (86.6% , 93.2%) (200 mM) مقارنة بالشواهد (80% و 53.2%). إستعمال هذه النبتة الملحية و كذا *Streptomyces* sp في التربة الملحية يساهم بفعالية في مقاومة الإجهاد الملحي و تحسين المنتج الزراعي.

الكلمات المفتاحية: البكتيريا الخيطية، *Salsola vermiculata*، *tréhalose*, *proline* *glycine betaine*، الإجهاد الملحي، الوقاية من الضغط الأسموزي، *Triticum durum* L.

Résumé : Sept souches actinomycétales sont isolées d'un sol fertile de la région d'El-Ouissia (Nord de Sétif) sur le milieu amidon-caséine. La souche SF5 et celle de référence *Nocardiopsis* sp. MADO3 produisent les teneurs les plus élevées en acide indole acétique (55.58 et 39.38 $\mu\text{g/ml}$ respectivement). Elles sont actives contre certains champignons et bactéries. *Streptomyces* sp. MADO2 (souche de référence) possède également cette activité antimicrobienne. Les colonies matures de la souche SF5 sont sèches, poudreuses, à bords plats et à contours irréguliers. Cette forme est caractéristique des colonies du genre *Streptomyces*. La couleur du mycélium aérien est blanche, tandis qu'elle est jaune sur mycélium végétatif, elles ont aussi une odeur du sol caractéristique du genre *Streptomyces*. En se basant sur les caractères morphologiques et culturels, cet isolat est désigné comme étant *Streptomyces*. *Streptomyces* sp. SF5 et les souches MADO2 et MADO3 sont halophiles modérées. La teneur en NaCl ainsi que la nature du milieu de culture influencent fortement sur leur halotolérance. L'effet osmoprotecteur de la glycine bétaine, de la proline et du tréhalose sur la restauration de la croissance de *Streptomyces* sp. et *Nocardiopsis* sp. est évident à des concentrations salines inhibitrices (500 , 800 et 1000 mM), cependant, à de faibles osmolarités (100 mM), ils inhibent leur développement. L'extrait de *Salsola vermiculata* osmoprotège *Streptomyces* sp. SF5 et *Streptomyces* sp. MADO2 en présence de fortes teneurs de NaCl. La germination de *Triticum durum* L., les longueurs des racines et des tiges, le poids sec des tiges, les teneurs en chlorophylles a, b et en caroténoïdes sont fortement inhibées par le NaCl, principalement à 200 mM. Cet effet est plus prononcé sur les paramètres étudiés en présence de *S. vermiculata* combinée avec *Streptomyces* sp. SF5. Les taux de germination sur sol en présence de NaCl (0 , 100 et 200 mM) sont respectivement de 46.66% , 40% et 26.6% par comparaison aux témoins (100% , 80% et 53.2%). Cependant, l'apport séparé de *S. vermiculata* ou de *Streptomyces* sp. SF5 restaure efficacement la germination et la croissance de *Triticum durum* L. Les taux de germination sont respectivement de (86.6% , 86.6%) (100 mM) et (86.6% , 93.2%) (200 mM) par rapport aux échantillons salés (80% et 53.2%). L'apport de cette halophyte et de *Streptomyces* sp. SF5 à des sols salés serait extrêmement utile pour lutter contre ce stress et améliorer les rendements agricoles.

Mots clés : Actinomycètes, *Streptomyces* sp. SF5, glycine bétaine, proline, tréhalose, *Salsola vermiculata*, stress salin, effet osmoprotecteur, *Triticum durum* L.

Abstract: Seven actinomycetes strains were isolated from a fertile soil of El-Ouissia (North of Sétif). SF5 and *Nocardiopsis* sp. MADO3 strains produced high levels of acetic indole acid (55.58 and 39.38 $\mu\text{g/ml}$ respectively). They showed also an antimicrobial activity against some bacteria and fungi beside *Streptomyces* sp. MADO2. *Streptomyces* colonies can be easily identified by their opaque, rough non-spreading morphology and their earthy odor. Based on cultural and morphological characters, this isolate is designated as *Streptomyces*. The three actinomycete strains are moderately halophiles and their behavior towards salt stress is different depending on the degree of salinity and the culture medium. The osmoprotective effect of glycine betaine, proline and trehalose on the restoration of the growth of *Streptomyces* sp. and *Nocardiopsis* sp. is obviously in the presence of high osmolarities. However, at low osmolarities they inhibit their growth.

Salsola vermiculata showed a potential osmoprotective action on the restoration of the growth of *Streptomyces* sp. SF5 and *Streptomyces* sp. MADO2. Germination of *Triticum durum* L. the lengths and the dry weight of roots and stems, chlorophyll a, b and carotenoids contents were strongly inhibited mainly at 200 mM/NaCl. However, it should be noted that the inhibitory effect on these parameters is more pronounced in the presence of *S. vermiculata* combined with *Streptomyces* sp. Germination rates in soil at (0 , 100 and 200 mM/NaCl) are respectively 46.66% , 40% et 26.6% compared to controls (100% , 80% et 53.2%). Separately application of *S. vermiculata* or *Streptomyces* sp. SF5 restores strongly germination and growth of *Triticum durum* L. Germination rates are respectively (86.6% , 86.6%) (100 mM) and (86.6% , 93.2%) (200 mM) compared to salted controls (80% and 53.2%). The use of this halophyte and *Streptomyces* sp. SF5 in saline soils would be extremely useful to fight against this stress and improve crop yields.

Key words: Actinomycetes, *Streptomyces* sp. SF5, glycine betaine, proline, trehalose, *Salsola vermiculata*, salinity stress, osmoprotective effect, *Triticum durum* L.