



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي  
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



Université des Frères Mentouri Constantine  
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة  
كلية علوم الطبيعة والحياة

**Département : Microbiologie**

**قسم : الميكربولوجيا**

**Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master**

**Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie**

**Filière : Ecologie et environnement**

**Spécialité : Ecologie microbienne.**

Intitulé :

---

## **Activités hydrolytiques et antagonistes des moisissures isolées depuis le lac d'eau douce «Timerganine »**

---

**Présenté et soutenue par :**

**Le : 07/07/2019**

***BENMECHIRAH Nour Djihene & LIDJICI Yasmine***

**Jury d'évaluation :**

**Président du jury :** Dr. Abdelaziz Wided (M.C.B. UFM Constantine1).

**Rapporteur :** Dr. BENKAHOUL Malika (M.C.B. UFM Constantine1).

**Examineurs :** Dr. LEGHLIMI Hind (M.C.A.UFM Constantine1).

***Année universitaire  
2018 - 2019***

# Remerciements

Nous tenons tout d'abord à remercier Dieu tout puissant, qui en son nom et avec Sa protection, nous avons réussi à réaliser notre travail.

Ce travail a été réalisé au sein du Laboratoire de zoologie et du laboratoire de microbiologie au bloque de science, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Mentouri Constantine.

Nos profonds remerciements et notre gratitude s'adressent à notre encadreur

**Mme. Benkahoul** pour sa précieuse aide, sa *gentillesse*, pour ses orientations et le temps qu'elle Nous a accordé pour notre encadrement.

Nous tenons aussi à présenter nos vifs remerciements et notre respect au jury Pour l'honneur qu'il nous a fait en acceptant de juger ce mémoire :

**Melle. Abdelaziz**, En tant que présidente du jury

**Mme. Leghlimi**, En tant qu'examinatrice

Nous remercions également

**Mme Almi, Melle Merian et Mme Mergoud** pour *son aide précieuse et ses conseils judicieux*.

Nous remercions également l'ensemble du personnel du laboratoire de Microbiologie.

## *Dédicaces*

Je dédie ce travail en premier lieu aux êtres, les plus chers au monde : **mes parents.**

Mon père Ammar et ma mère Leila

Quoi que je fasse je ne pourrais leur rendre ce qu'ils ont fait pour moi, si je suis arrivée là

C'est bien grâce à eux que dieu les bénisse, et leur accorde longue vie et les protège.

À mes chers frères : **Mouad** et **Abed el-rahman**

À mes chères sœurs : **Anfel** et **tawba**

À Mon binôme : **Yasmine**

A toute ma famille et tous mes amis

**Nour djihene**

*Dédicaces*

*À Mes chers **parents**, que nulle dédicace ne puisse exprimer mes sincères sentiments, pour leur patience illimitée, leur encouragement contenu, leur aide, en témoignage de mon profond amour et respect pour leurs grands sacrifices*

À mes chers frères : **Saïd** et **Wassim Tarek**

À mes chères tantes : **Nacira**, **Nafissa** et **Houria**

Toute la famille : **Lidjici** et **Kourta**

*À mon binôme : **Nour Djihene***

*À toutes mes amies et à tous ceux que j'aime.*

*Yasmine*

## Table des matières

<i>Remerciement</i>	
<i>Liste des abréviations</i>	
<i>Liste des tableaux</i>	
<i>Liste des figures</i>	
<b>Introduction</b>	1
<b><i>Revue bibliographique</i></b>	
<b><i>Chapitre I : Description de site d'étude</i></b>	
1. Zone humides	3
1.1. Définition	3
1.2. Les lacs d'eau douce	3
2. Description de Garaet Timerganine	3
3. Situation géographique	5
<b><i>Chapitre II : Les moisissures</i></b>	
1. Généralités sur les moisissures	6
1.1. Définition	6
1.2. Classification	7
1.3. Mode de reproduction	8
1.4. Condition de croissance	9
1.4.1. Macroéléments	9
1.4.2. Source minérale	9
1.4.3. Facteurs physicochimiques	10
1.5. Condition d'isolement	11
2. Intérêt industriel des moisissures	12
2.1. Intérêt alimentaire	12
2.2. Intérêt chimique	12
2.3. Intérêt pharmaceutique	12
2.4. Intérêt médicale	13
<b><i>Chapitre III : Les enzymes</i></b>	
1. Les enzymes	15
1.1. Définition	15
1.2. Classification des enzymes	15
1.3. Origine des enzymes industrielles	16
2. Les hydrolases	16
2.1. Les amylases	16
2.2. Les cellulases	17
2.3. Les pectinases	17
2.4. Les protéases	18
<b><i>Matériel et Méthodes</i></b>	
1. Matériel biologique	19
1.1. Prélèvement	19
1.2. Isolement des microorganismes	20
2. Identification de l'isolat fongique sélectionné	21
2.1. Identification des moisissures sélectionnées	21
2.1.1. Identification macroscopique	21
2.1.2. Identification microscopique	21
3. Mise en évidence des activités enzymatiques	21

3.1. Mise en évidence de l'activité amylolytique	21
3.2. Mise en évidence de l'activité cellulolytique	22
3.3. Mise en évidence de l'activité pectinolytique	22
3.4. Mise en évidence de l'activité protéolytique	22
4. Test d'antagonisme	23
5. Identification de la bactérie contaminante	24
5.1. Identification macroscopique	24
5.2. Identification microscopique	24
5.3. Tests biochimiques	25
<b><i>Résultats et Discussion</i></b>	
1. Isolement des microorganismes	28
2. Identification des moisissures sélectionnées	29
2.1. Identification macroscopique	29
2.2. Identification microscopique	32
3. Analyse statistique	40
4. Mise en évidence des activités enzymatiques des moisissures	41
4.1. Activités amylolytique	45
4.2. Activités cellulolytique	45
4.3. Activités pectinolytique	45
4.4. Activités protéolytique	46
5. Teste d'antagonisme	47
6. Identification de la bactérie contaminante	57
6.1. Identification macroscopique	57
6.2. Coloration de Gram	58
6.3. Caractères biochimiques	58
6.3.1. Recherche d'oxydase	58
6.3.2. Recherche de catalase	58
6.3.3. Galerie Api 20 NE	59
<b><i>Conclusion</i></b>	61
<b><i>Référence bibliographique</i></b>	63
<b><i>Annexes</i></b>	
<b><i>Résumé</i></b>	

*Liste*  
*Des abréviations*  
*Des tableaux*  
*Des figures*

- Aw** : Activité de l'eau
- EC**: Enzyme Commission
- ATB** : antibiotique
- PDA** : Potatos Dextrose Agar
- CMC** : Carboxyméthylcellulose
- Φ**: Diamètre
- DT** : Croissance diamétrale du témoin ;
- DPA** : Croissance diamétrale mycélienne du pathogène en présence de l'antagoniste,
- IC%** : Inhibition de la croissance.
- GN** : Gélose Nutritive
- OX**: Oxydase
- Api**: Analytical profile index
- NE** : Non entérobactéries
- PNPG** : 4-Nitrophenyl-β-D- glucopyranoside
- GLU** : D-glucose
- Pac** : Politique agricole commune
- S** : Souche
- ADH** : L-arginine
- URE** : Urée
- ESC** : Esculine citrate de fer
- GEL**: Gélatine (origine bovine)
- TRP**: L-tryptophane
- NIT1** : Nitrate réductase 1
- NIT2** : Nitrate réductase 2



Numéro	Titre	Page
Tableau 1	Exemples d'enzymes produites par les moisissures.	13
Tableau 2	Classification des enzymes.	15
Tableau 3	Les sites de prélèvement des échantillons (sol et eau).	20
Tableau 4	La distribution des moisissures isolées depuis les échantillons.	28
Tableau 5	Observation macroscopique des colonies des moisissures sur PDA à 30 °C.	29
Tableau 6	Observation microscopique des moisissures isolées.	33
Tableau 7	Zones d'hydrolyses de souches des moisissures testées après cinq jours d'incubation.	41
Tableau 8	Diamètre (mm) de zones d'hydrolyse des souches fongiques testées après cinq jours incubation à 30 °C.	44
Tableau 9	Pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne des souches isolées par : <i>Cladosporium cladosporioides</i> cas de confrontation directe.	47
Tableau10	Test d'antagonisme des isolats fongique entre eux.	49
Tableau11	La résistance d' <i>Aspergillus sp</i> à la contamination bactérienne.	57

<b>Numéro</b>	<b>Titre</b>	<b>Page</b>
Figure 1	Situation géographique du Lac de Timerganine dans les zones humides des hautes plaines de l'Est l'Algérien.	4
Figure 2	Localisation de Garaet Timerganine - Oum El Bouaghi	5
Figure 3	Structure d'un hyphe et son développement vers la formation d'un mycélium (A) : hyphe coenocytique ; (B) : hyphe cloisonné.	6
Figure 4	Principales classes des moisissures.	8
Figure 5	Différents modes de sporulation et différents types de spores associées.	9
Figure 6	Photo d'une vue générale de Garaet Timerganine prise le 09 mars 2019.	19
Figure 7	Présentation schématique de la confrontation directe.	23
Figure 8	Pourcentage des genres de moisissures identifiées.	40
Figure 9	Aspect des colonies de la bactérie contaminante dans une boîte de Pétri.	57
Figure 10	Les bacilles Gram négatif de à objectif 100X.	58
Figure 11	Résultat négatif de l'oxydase chez la bactérie étudiée.	58
Figure 12	Résultat positif de catalase chez la bactérie étudiée.	58
Figure 13	Résultat de galerie API 20 NE.	59
Figure 14	Résultat de galerie API 20 NE de LAB.UPBM.ORG.	59

# *Introduction*

Les moisissures, ou les champignons filamenteux, sont des acteurs importants du monde microbien. Ils sont impliqués dans une multitude de processus biologiques de l'environnement. Ils présentent, en outre, un intérêt industriel, en raison à la fois de leur croissance rapide et leur arsenal enzymatique très développé. Ce dernier est dû à un patrimoine génétique particulier qui explique leur grande capacité d'adaptation (**Leveau et Bouix, 1993**).

Par ailleurs, les moisissures synthétisent un grand nombre de substances complexes : acides organiques, alcaloïdes, antibiotiques, terpènes et enzymes. Ces substances sont économiquement très importantes (**Sheikh, 2010 ; Mehravar et Sardari, 2011 ; Pereira et al., 2013**). Grace à leurs propriétés, les moisissures sont également des agents de bio contrôle efficace utilisés dans la lutte biologique qui présente un rôle important dans la restauration de la biodiversité dans les écosystèmes par l'addition des antagonistes naturels (**Altieri, 1999 ; Nautiyal et al., 2000**).

La demande mondiale du marché des enzymes d'origine microbienne croît d'une année à l'autre et ce afin d'améliorer certains procédés de fabrications tels que l'industrie du textile, la papeterie, la dépollution, l'industrie alimentaire (**Dvail et al., 2010**).

Pour faire face à la demande croissante des industriels notamment dans le domaine des biocatalyses et en se basant sur le modèle de la synthèse organique, de nombreux efforts ont été fournis dans la recherche pour trouver des enzymes d'intérêt industriel. A cet effet, une attention particulière pour les enzymes provenant des moisissures a fait l'objet de plusieurs études. Environ 40% des enzymes industrielles sont d'origine fongique (**Botton et al ; 1999**).

Dans ce contexte, le marché mondial des enzymes est représenté par 80% des hydrolases, particulièrement les amylases et les protéases (**Morvan ,2010**). Cependant la cellulase et la pectinase sont considérées parmi les plus importantes enzymes à l'échelle industrielle, les rendant l'un des outils-clés des biotechnologies (**Little, 2004**). Dans ce cadre des objectifs ont été tracés et une démarche a été suivie :

- D'abord l'isolement des souches fongiques à partir du lac d'eau douce de Timerganine.
- Ensuite une purification et une identification des isolats.
- Suivie d'une mise en évidence de la production de quatre enzymes (Amylase, Cellulase, Pectinase, Protéase) par ces isolats.

- Enfin des tests d'antagonisme entre les isolats et contre une souche entomopathogène (il s'agit de *Cladosporium cladosporioides*).

*Chapitre I :*  
*Description de site d'étude*

## 1. Zones humides

### 1.1. Définition

Le terme « zone humide » ou « *wetland* » en anglais désigne une région où le principal facteur d'influence du biotope et de sa biocénose est l'eau, espace de transition entre la terre et l'eau. Une zone humide représente un écotone remplissant diverses fonctions lui conférant des valeurs biologiques, hydrologiques, économiques et sociologiques remarquables. Les zones humides regroupent les écosystèmes les plus productifs et les plus riches de la planète (Ouldjaoui, 2010).

### 1.2. Les lacs d'eau douce

Les zones humides méditerranéennes regroupent une grande variété d'habitats naturels : deltas des fleuves, lacs et marais (eau douce, saumâtre ou salée), rivières permanentes ou oueds, forêts inondables des bordures de fleuves.

Les lacs se forment soit à l'intérieur des terres, soit par adoucissement d'une lagune marine isolée de la mer et alimentée par des cours d'eau (comme dans le delta du Nil, et du Rhône). En Afrique du Nord, hormis les lagunes marines et deltaïques, on ne trouve que peu de lacs permanents, les eaux libres disparaissant rapidement du fait de l'importance de l'évaporation. (Mokrani, 2011).

## 2. Description de Garaet Timerganine

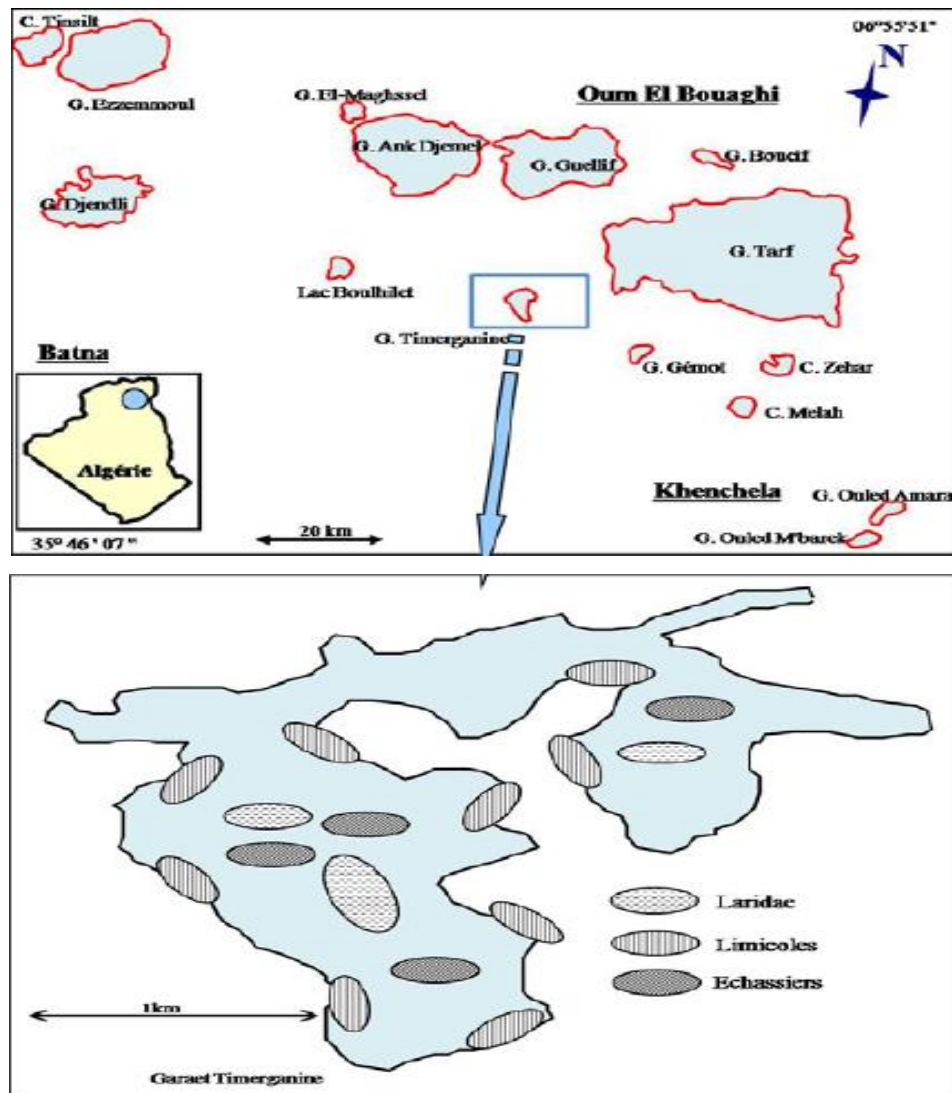
Le complexe des zones humides des hautes plaines de l'Est algérien s'étend sur près de 300 km de l'Est à l'Ouest et compte quinze plans d'eau (Chotts, Sebkhass et Garaets) Ces Hauts Plateaux couvrent une grande superficie principalement de la wilaya de Sétif et d'Oum El Bouaghi, (Houhamdi *et al.*, 2009).

La Garaet de Timerganine (étymologiquement, série de petites mares d'eau interconnectées) (Houhamdi *et al.*, 2009) fait partie de ce complexe et représente l'unique plan d'eau douce de la région (figure 1) (Sedik *et al.*, 2010).

La Garaet de Timerganine est une dépression endoréique alimentée par l'Oued Boulefreis et par quelques cours d'eau intermittents sur la rive ouest du Garaet. La dépression est constituée de deux bassins distincts : le Grand Timerganine et le Petit Timerganine. (Mazzi, 2009).

Les limites des deux zones humides constituant la Garaet de Timerganine ont été tracées à l'aide d'indices liés à la flore (Critère 2 : présence ou absence d'une végétation hydrophile), à l'hydrologie (Critère 1) et à l'occupation des terres (Critère 5 :

limite entre les espaces naturels et les milieux anthropisés). Au Sud et sur ses pourtours, la Garaet de Timerganine est délimité par le milieu terrestre steppique et par des cultures de blé, alors qu'au nord, il est délimité par la fin du système palustre associé à la plaine inondable de l'Oued Boulefreis. Selon ces critères, la zone humide couvre une superficie de 286,7 ha dont 84,0 ha pour le Petit Timerganine et 202,7 ha pour le Grand Timerganine. La cuvette de la Garaet de Timerganine possède un fond argileux et est entourée de dunes sableuses peu consolidées (Saheb, 2009).



**Figure1** : Situation géographique du Lac de Timerganine dans les zones humides des hautes plaines de l'Est l'Algérien (Seddik et *al.*, 2010).



### 3. Situation géographique

GaraetTimerganine est situé à 25 km au Sud d'Oum El Bouaghi. Elle est limitée au nord par la commune de Aïn Zitoun et au Sud par la plaine de Remila. Administrativement, elle appartient à la wilaya d'Oum El Bouaghi, commune de Aïn Zitoun. Située à 35° 39'33" Nord et 06°59'02" Est, ce plan d'eau douce endoréique est alimenté essentiellement par Oued Boulefreiss qui prend naissance dans le massif des Aurès et qui inonde les différentes cuvettes de Timerganine(**figure2**). Cette dernière se caractérise par sa profondeur d'eau relativement importante dans la région. Elle est accessible à partir de la route nationale reliant Oum El Bouaghi à Khenchela(**Sedik et al., 2010**)



**Figure 2 :** Localisation de GaraetTimerganine - Oum El Bouaghi  
(Source : Google earth).21/03/2019.

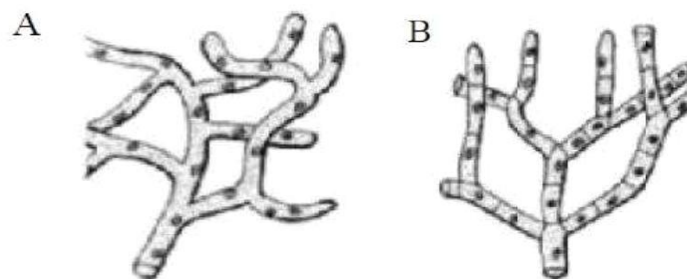
*Chapitre II :*  
*Les moisissures*

## 1. Les moisissures

Le terme « moisissure » désigne tous les champignons microscopiques eucaryotes, filamenteux et pluricellulaires du règne des mycètes appelés les « vrais » champignons ou Eumycètes (Regnault,1990 ; Chasseur et Nolard,2003). Certaines vivent en symbiose avec les végétaux, d'autres sont des parasites des végétaux ou des animaux alors que certains sont des saprophytes se développant aux dépens des substrats inertes ou en voie de décomposition (Bourgeois *et al.*, 1989 ; Leveau et Bouix, 1993).

### 1.1. Définition

Les champignons filamenteux, appelés aussi moisissures sont définies comme des microorganismes hétérotrophes filamenteux et immobiles. Leur structure cellulaire est celle d'une cellule eucaryote classique et sont caractérisées par une structure mycélienne (Nicklinet *al.*, 2000). Leur appareil végétatif (thalle) est constitué par des filaments ramifiés « les hyphes » (Gonçalves *et al.*, 2005). Leur organisation est coenocytique à l'intérieur de la structure filamenteuse, entourée d'une paroi rigide. Les hyphes de ces champignons sont dotés de cloisons transversales à intervalles réguliers. Ces derniers sont percés d'un pore central permettant la libre circulation du cytoplasme et des noyaux (figure 3) (Justa-Schuchet *al.*, 2010). Néanmoins, on dit qu'ils ont un mycélium « cloisonné ». Le mycélium peut se différencier des organes forts variés selon les groupes, spécialisés dans la multiplication et la dissémination, auxquels on accorde la dénomination globale de spores (Bourgeois, 1989).



**Figure 3 :** Structure d'une hyphe et son développement vers la formation d'un mycélium (A) : hyphe coenocytique ; (B) : hyphe cloisonnée (Chabasse *et al.*, 2002).

## 1.2. Classification

La classification est basée sur la morphologie (structure du mycélium) et le mode de reproduction des moisissures (**Davet, 1996**). Ces derniers ne correspondent pas à un groupe systématique homogène, mais se situent en diverses familles de champignons microscopiques, les Eumycètes (les vrais champignons) forment un groupe très vaste incluant les classes principales des moisissures (**Bourgeois, 1989**), à savoir les Zygomycètes, les Ascomycètes, les Basidiomycètes et les Deutéromycètes (**figure4**).

- **Zygomycete**

Ces moisissures possèdent un thalle mycélien non cloisonné et des organes de reproduction sexuée (**Guiraud, 1998**). La famille la plus importante dans cette classe est celle de Mucorales qui comprennent un grand nombre de moisissures saprophytes mais aussi quelques espèces parasites des champignons, des animaux et des hommes (mucormycoses) et surtout des contaminants de nombreux produits alimentaires (**Leveau et Bouix, 1993 ; Boiron, 1996**). Certaines Mucorales sont parfois utilisées industriellement en raison de leurs activités enzymatiques (amylase, protéase...) comme *Rhizopus* et *Mucor* (**Guiraud, 1998**).

- **Ascomycètes**

Les Ascomycètes sont définis comme des champignons à thalle mycélien cloisonné, dont le mode de reproduction est sexué avec des spores endogènes (ascospores). Cette classe regroupe de nombreux parasites des végétaux mais aussi de nombreuses moisissures (**Guiraud, 1998**). Elles sont cependant plus particulièrement nombreuses dans l'ordre des Eurotiales, des Microsciales et des Sphaeriales. Dans cette classe, le genre le plus connu est *Endothia* et *Neurospora* (**Bourgeois, 1989**).

- **Basidiomycètes**

Il s'agit de certaines moisissures parasites. Elles sont caractérisées par un thalle à mycélium septé et une reproduction sexuée avec la formation de spores exogènes (basidiospores), c'est le cas de *Agaricus* et *Coprinus* (**Botton et al., 1999**).

- **Deutéromycètes**

Les deutéromycètes, également appelés champignons imparfaits sont caractérisés par un mycélium cloisonné et une reproduction végétative réalisée par des spores asexuées ou par simple fragmentation du mycélium (**Boiron, 1996**). Ces moisissures constituent la majeure partie des Hyphales. Elles sont classées en fonction des caractéristiques des organes conidiens et du mode de groupement des hyphes. Le groupe

des Deutéromycètes contient un grand nombre de contaminants de végétaux et de produits alimentaires : *Trichoderma*, *Cephalosporium*, *Fusarium*, *Geotrichum* et regroupe aussi les *Penicillium* et les *Aspergillus* (Frazier, 1967 ; Punt et al, 2002).

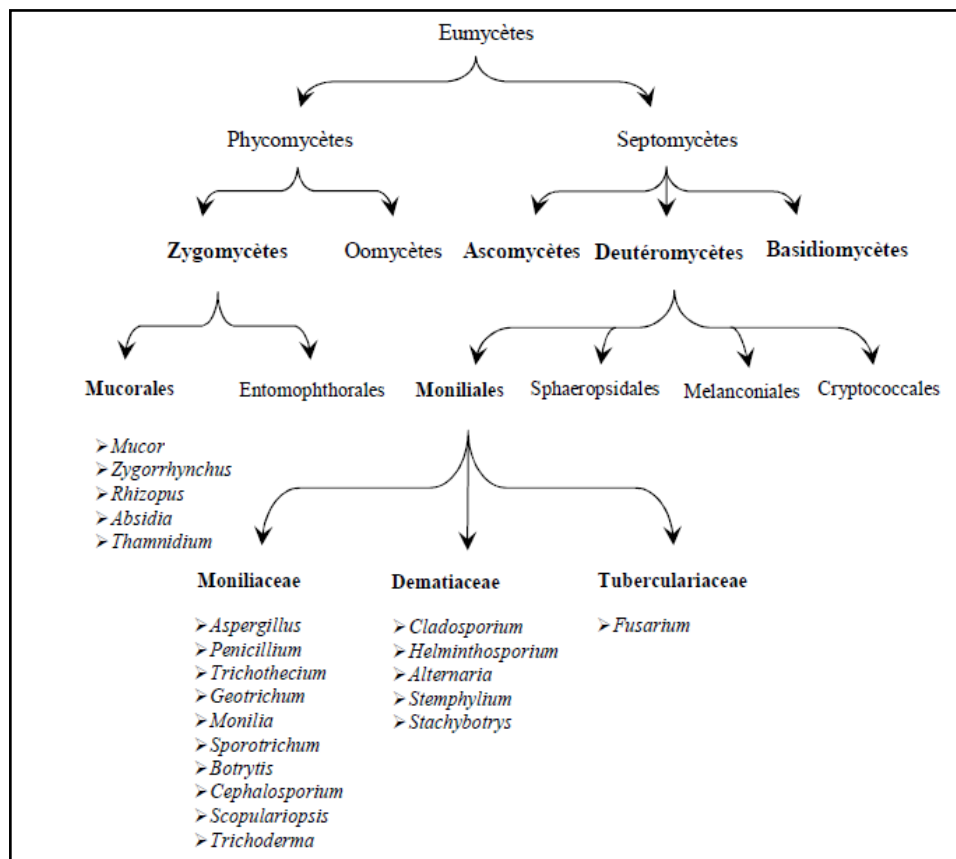


Figure4 : Principales classes des moisissures (Frazier, 1967).

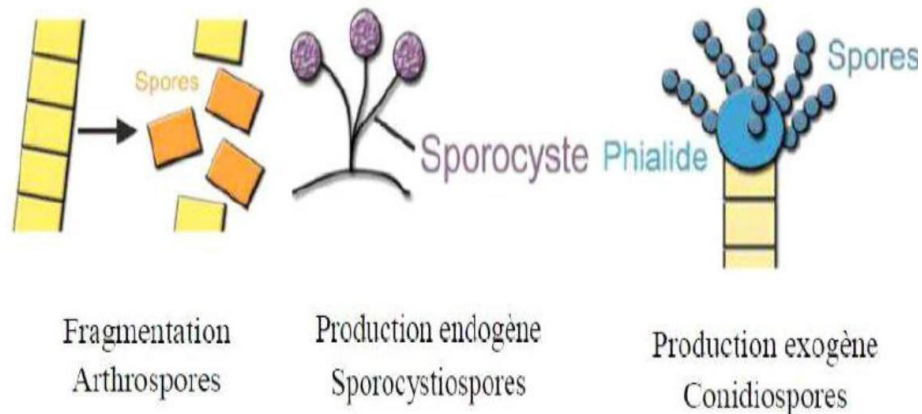
### 1.3. Mode de reproduction

Les moisissures produisent des organes de reproduction que l'on appelle de façon générale spores et qui peuvent avoir une origine sexuelle ou végétative. Les spores d'origine sexuelle résultent d'une fécondation (zygospores et oospores) ou d'une méiose (ascospores ou basidiospores) alors que les spores d'origine végétative résultent d'une simple mitose que l'on appelle fréquemment conidies. Elles assurent la reproduction et la dissémination chez les espèces de formes imparfaites, mais on les trouve également chez les autres groupes où elles coexistent au côté des formes de reproduction sexuée et leur type varie selon les moisissures (figure 5).

- **Les thallospores** : sont formées aux dépens du thalle par transformation d'éléments préexistants.

- **Les sporangiospores** : sont des cellules flagellées ou non ne provenant pas d'une fraction préexistante du thalle.

- **Les conidiospores** : sont des cellules qui ne sont pas issues directement d'une portion préexistante du thalle. Ces spores toujours terminales naissent d'un filament appelé conidiophore (metulae, phialide, etc.) (**Guiraud, 1998**).



**Figure 5** : Différents modes de sporulation et différents types de spores associées (**Barnett et Hunter 1998**).

## 1.4. Condition de croissance

### 1.4.1. Macroéléments

Le carbone constitue l'élément le plus abondant dans la cellule fongique il représente environ 50% de la cellule, tandis que la teneur en azote varie entre 10 et 15% (**Riviere, 1975 ; Scriban, 1999**). Ainsi, le rapport carbone/azote influence considérablement la croissance et il est pour les mycètes de l'ordre de 20/1 ; un rapport proche de 20 permet une bonne croissance mycélienne (**Barker et Worgan ; 1981 ; Bottonet al., 1990**). Grâce à la glycolyse et au métabolisme aérobie, les mycètes assimilent les sucres facilement métabolisables comme le glucose, le maltose, le saccharose et les polymères tels que l'amidon (**Nicklinet al., 1999**).

Par ailleurs, tous les champignons filamenteux peuvent métaboliser les acides aminés et l'urée. La plupart d'entre eux utilisent l'ammonium aucun ne peut fixer l'azote atmosphérique. Les sources complexes d'azote comme les peptides et les protéines ne sont utilisables par les hyphes qu'après leur destruction en acides aminés (**Nicklinet al., 1990**).

### 1.4.2. Source minérale

La présence des ions minéraux dans le milieu de culture est nécessaire pour la croissance et la reproduction de plusieurs espèces fongiques, il s'agit essentiellement de sulfate, de magnésium, de potassium, de sodium et de phosphate avec des

concentrations plus au moins différentes selon l'espèce (**Uchicobaetal., 2001**). Des traces d'éléments tels que le fer, cuivre, le manganèse, les pigments, les acides organiques ... (**Bioron, 1996**).

### 1.4.3. Facteurs physicochimiques

Les facteurs physicochimiques ont une grande influence sur le développement des moisissures ainsi que sur la germination, quelques paramètres sont importants tels que :

#### ❖ Température

La température joue un rôle prépondérant dans la croissance mycélienne, elle intervient également dans la sporulation et la germination des spores (**Bourgeois, 1989**). La plupart des moisissures sont mésophiles avec des optima de croissance de 25 à 35°C (**Botton et al., 1999 ; Julien, 2002**). Quelques espèces sont thermotolérantes ou thermophiles et peuvent croître à haute température (au-dessus de 50°C) avec une croissance optimale aux environs de 20 à 25°C, *Aspergillus fumigatus* est un bon exemple (**Botton et al., 1999 ; Nicklinet al., 2000**).

D'autres sont des psychrophiles ou psychrotolérantes se développant à basses températures (entre -5 et 10°C) tels que *Helicostylum pulchrum*, *Chrysosporium pannorum* et *Cladosporium herbarum*, ces espèces peuvent survivre même à -60°C, on les rencontre dans des entrepôts frigorifiques (**Davet, 1996 ; Botton et al., 1999**).

#### ❖ Humidité

Les moisissures ont en général un besoin en eau faible par rapport aux autres microorganismes (**Davet, 1996**). Néanmoins, l'humidité a une grande influence sur le développement des moisissures non seulement sur la croissance mycélienne et la sporulation mais plus particulièrement sur la germination des spores (**Bourgeois, 1989**). - moisissures à mycélium non cloisonné sont les plus sensibles à la dessiccation ; leur développement cesse lorsque le potentiel hydrique descend en dessous de -4 MPa (méga pascal). Les moisissures à mycélium cloisonné supportent en moyenne jusqu'à -10 MPa. Cependant, les *Aspergillus* et les *Penicillium* peuvent en général se développer à des potentiels hydriques de l'ordre de -20 MPa (**Davet, 1996**).

#### ❖ PH

La grande majorité des champignons filamenteux se développent dans une zone de pH de 4.5 à 8.0 (**Botton et al., 1999**). Cependant, les enzymes extracellulaires

produites dans des milieux complexes peuvent avoir des optima de pH d'activité très différents (plus acides ou plus basiques) (**Botton *et al.*, 1999**).

Le pH influe sur la croissance de ces microorganismes soit indirectement en agissant sur la disponibilité des éléments nutritifs (à pH acide, le fer reste sous forme d'ions ferreux assimilable), soit directement par action sur la membrane cellulaire. Par ailleurs, les champignons modifient souvent le pH du milieu par absorption sélective et échange d'ions, production de CO<sub>2</sub> ou de NH<sub>3</sub> ou par production d'acides(**Boiron, 1996**).

#### ❖ Oxygène

La quantité d'oxygène mise à la disposition des moisissures est un facteur important de développement. La plupart sont aérobies, les plus exigeantes vivent dans les régions périphériques des substrats, les moins exigeants peuvent se développer en profondeur comme *Fusarium oxysporum* et *Aspergillus fumigatus*. Certaines peuvent même supporter une anaérobiose très stricte comme *Neocallimastix*(**Bourgeois, 1989 ; Botton *et al.*, 1999**).

#### ❖ Lumière

Les radiations du spectre visible (380 – 720) n'ont en général pas d'action sur la croissance végétative des champignons mais peuvent agir sur la sporulation. La plupart des moisissures n'exigent pas de lumière ni pour leur croissance ni pour leur germination de leurs spores (**Botton *et al.*, 1999**).

#### ❖ Activité en eau (Aw)

L'aw d'un aliment dépend de sa composition chimique, c'est-à-dire de la quantité d'eau retenue par les sels, sucres et protéines, ainsi que de ses caractéristiques physiques (porosité, polarité). Ce paramètre peut varier de 0 (pour les substrats dans lesquels toute l'eau est retenue) à 1 (pour l'eau pure).

Les moisissures sont, de façon schématique, plus aérotolérantes que les autres microorganismes (bactéries, levures). La plupart des moisissures se développent bien pour des activités en eau voisines de 0,85. Par conséquent, beaucoup de produits dont l'activité hydrique ne permet pas la croissance bactérienne peuvent être colonisés par les moisissures.

### 1.5. Conditions d'isolement

La plupart des milieux naturels air, sol, eau et matières premières alimentaires peuvent servir de matériel de départ pour l'isolement des moisissures (**Clark *et al.*, 1985 ; Karam, 2000 ; Julien, 2002**), ces échantillons naturels contiennent aussi plusieurs



espèces bactériennes et des levures. L'élimination de ces microorganismes pour l'isolement sélectif des champignons filamenteux est réalisée en rajoutant un antibiotique aux milieux de cultures (Ulacio *et al.*, 1997).

## 2. Intérêt industriel des moisissures

Actuellement, les moisissures jouent un rôle primordial dans divers domaines d'applications. Elles sont utilisées dans les industries alimentaires, chimiques, la biolixiviation et la biotransformation...etc. Cependant l'industrie n'exploite commercialement qu'un petit nombre de métabolites de quelques espèces seulement (Boiron, 1996). Leur intérêt économique repose sur leur activité biologique dans la production d'une grande diversité de molécules produites au cours des métabolismes primaires et secondaires, exploitées en particulier par l'industrie pharmaceutique et en médecine (Larpend-Gourgaud et Sanglier, 1992).

### 2.1. Intérêt alimentaire

Les enzymes fongiques restent toujours les outils clés de la biotechnologie et reflètent de plus en plus l'importance et le rôle infini des moisissures dans les différentes applications alimentaires. *Aspergillus niger* est un bon exemple, il produit la cellulase, l'amylase, l'invertase et la pectinase, employées principalement comme des catalyseurs biologiques en glucoserie, brasserie et pour la fabrication des boissons. Cette moisissure secrète aussi des protéases, des lipases et des estérases utilisées dans différentes applications alimentaires (Kosikowski, 1988 ; Scriban, 1999).

### 2.2. Intérêt chimique

Il s'agit essentiellement de l'utilisation des protéases alcalines d'*Aspergillus oryzae* et de *Stachybotrys chartarum* dans les détergents (Miller, 2002).

La production de cellulase par *Aspergillus niger* et *Trichoderma harzianum* présente une diversité d'applications industrielles, où 48% de sa production par ces deux espèces fongiques et le genre *Penicillium* est utilisée pour l'industrialisation des papiers et les textiles (Delgado-Jarana *et al.*, 2002).

### 2.3. Intérêt pharmaceutique

La production industrielle en vitamines se limite à une partie de la synthèse de la riboflavine produite spécialement par *Eremothecium ashbyi* cultivé en milieu agité et supplémenté en lipides. La vitamine A pourrait faire l'objet d'une production

microbiologique par les champignons notamment les espèces de l'ordre des mucorales (Botton *et al.*, 1999).

#### 2.4. Intérêt médical

Les premiers produits d'origine fongique en médecine sont les alcaloïdes de l'ergot de seigle (ergotamine), utilisés en gynécologie et pour diverses autres indications (Boiron, 1996 ; Botton *et al.*, 1999).

La découverte de la cyclosporine, puissant agent immunodépresseur, puis la mise en évidence de corrélation entre l'activité de certaines enzymes et diverses pathologies ont permis de donner un grand essor aux sciences médicales et pharmaceutiques (Botton *et al.*, 1999 ; Richard, 2005).

#### • Production des enzymes par les moisissures

Le **tableau 1** regroupe quelques enzymes industrielles produites par quelques moisissures.

**Tableau 1 :**Exemples d'enzymes produites par les moisissures.

Enzymes	Espèces	Références
Protéase	<i>Aspergillus oryzae</i>	(Garcia-Gomez <i>et al.</i> , 2009 ; Benkahoulet <i>et al.</i> , 2017).
	<i>Aspergillus terreus</i>	(Wu <i>et al.</i> , 2006).
	<i>Aspergillus clavatus</i> ESI	(Hajji <i>et al.</i> , 2007).
	<i>Mucor circinelloides</i>	(Sathyaetal., 2009).
	<i>Conidiobolus coronatus</i>	(Laxmanetal., 2005).
	<i>Penicillium</i> sp.	(Germano <i>et al.</i> , 2003).
	<i>Bauveria felina</i>	(Agrawal <i>et al.</i> , 2005).
Amylase ( $\alpha$ -amylase)	<i>Aspergillus oryzae</i>	(Agger <i>et al.</i> , 1998 ; Bennamoune <i>et al.</i> , 2002).
	<i>Aspergillus niger</i>	(Botton <i>et al.</i> , 1990 ; Dakhmouche <i>et al.</i> , 2002 ; Akbache et Bariout, 2007).
	<i>Aspergillus flavus</i> <i>Aspergillus sojae</i>	(Aidoo <i>et al.</i> , 1981 ; Khoo, 1994).
	<i>Rhizopus oryzae</i>	(Lucio <i>et al.</i> , 1996 ; Cuveillier, 1999 ; Akbache et Bariout, 2007).
	<i>Penicillium griseoroseum</i>	(Ray, 2001).
	<i>Penicillium fellutanum</i> <i>Penicillium chrysogenum</i>	(Kathiresan et Mannivanan, 2006 ; Ertan et Balkan, 2007).
	<i>Alternaria alternata</i>	(Lateef <i>et al.</i> , 2004).
Cellulase	<i>Neocallimastix frontalis</i> , <i>Sphaeromonas communis</i> , <i>Piromonas commmunis</i> , <i>Chytridomycètes</i> <i>Trichodermaviridae</i> , <i>Trichodermareesei</i> ,	(Béguin et Aubert, 1992).

	<i>Trichoderma koningii,</i> <i>Aspergillus aculeatus</i> <i>Aspergillus nidulans,</i> <i>Aspergillus oryzae,</i> <i>Aspergillus niger,</i> <i>Aspergillus terreus,</i> <i>Fusarium solani,</i> <i>Sporotrichum pulverulentum,</i> <i>Chaetomium</i> <i>cellulolyticum,</i> <i>Humicola solens</i>	
<b>Pectinase</b>	<i>Aspergillus</i> <i>Aspergillus</i> <i>Aspergillus</i> <i>Rhizopus</i> <i>Mucor</i> <i>Penicillium</i> <i>Penicillium</i> <i>Trichoderma</i>	<b>(Priya. and Sashi., 2014).</b>

*Chapitre III :*  
*Les enzymes*

## 1. Les enzymes

### 1.1. Définition

Les enzymes sont des macromolécules de nature protéique. Elles sont constituées de plusieurs acides  $\alpha$ -aminés de la série L unis entre eux par une liaison formée par condensation entre le groupement carboxyle d'un acide aminé et le groupement amine d'un autre acide aminé afin de former une liaison amide. Les enzymes sont donc des polypeptides de masses moléculaires élevées entre 10 à 1000 kDa dans lequel sont arrangés les acides aminés. (**Vincent, 1996**).

En effet, les enzymes sont présentes dans les cellules de tous les organismes vivants où elles jouent un rôle essentiel en contrôlant les procédés métaboliques permettant aux nutriments d'être transformés en énergie et en matériaux cellulaires (**Bergmeyer et al., 1979 ; Amaud et al., 1993 ; Pelmont, 1995 ; Drouin, 2005**).

En 2005, plus de 3000 activités enzymatiques différentes ont été isolées et identifiées (**Patel et al., 2005**), la structure d'environ 1300 d'entre elles a été déterminée (**Leisola et al., 2001**).

### 1.2. Classification des enzymes

Le pouvoir catalytique des enzymes permet de produire de nouvelles substances et de l'énergie, indispensables au bon fonctionnement des organismes vivants. C'est en fonction de leur activité catalytique que celles-ci sont classées. Une nomenclature a été proposée par la commission des enzymes de l'union internationale de biochimie divisant les enzymes en six grandes classes (**Vincent, 1996**). (**tableau 2**).

**Tableau 2 : Classification des enzymes (Vincent, 1996).**

E.C (classe)	Classification	Type de réaction catalysée
E.C.1	Oxydoréductases	Oxydo-réduction
E.C.2	Transférases	Transfert de groupements fonctionnels
E.C.3	Hydrolases	Hydrolyse (coupe les liens chimiques par addition d'une molécule d'eau)
E.C.4	Lyases	Élimination de groupement et formation de doubles liaisons

E.C.5	Isomérasés	Isomérisation
E.C.6	Ligases	Formation de liaisons couplées à l'hydrolyse de l'ATP

E.C. (Enzyme Commission)

### 1.3. Origine des enzymes industrielles

Le marché global des enzymes industrielles et de spécialité conserve une forte croissance. Celle-ci a été estimée à plus de 1,5 milliards US\$ en 2000. (**García-Gómez et al., 2009 ; Rai et Mukherjee, 2010**).

Les microorganismes constituent la principale source d'enzymes industrielles. En effet, 50 % d'enzymes proviennent des champignons et des levures, 35 % des bactéries, alors que 15 % sont d'origine végétale ou animale (**Barnabé et al., 2003**).

Parmi les enzymes actives à des températures élevées d'intérêt industriel, les protéases, les lipases et d'autres hydrolases comme les cellulases, les chitinases et les amylases sans oublier la taq polymérase (**Van den burg, 2003**).

## 2. Les hydrolases

Les hydrolases sont des enzymes de dégradation. Elles provoquent la coupure d'une molécule et fixent les radicaux H et OH de l'eau sur les valences libérées. Ces enzymes ne nécessitent pas généralement de coenzymes, elles sont activables par des cations. Elles interviennent sur les fonctions éthers, acétals, esters phosphoriques, liaisons O-O des peroxydes, C-N des amides. Leur action sur quelques groupes de molécules a été étudiée. Les hydrolases produites par les champignons peuvent être endocellulaires (catalase, lactase et invertase) ou exocellulaires (amylases, cellulases, pectinases et protéases) (**Bornscheuer, 2002**).

### 2.1. Les amylases

Les amylases (EC.3.2.1.x) sont des enzymes appartenant à la troisième classe, celle des hydrolases, de type endoglycanases. Elles agissent sur les liaisons (1,4) de l'amidon. En effet, les amylases catalysent la dégradation des polymères d'amidon pour produire des dextrans et différents gluco-oligosaccharides de longueurs variables (**Gupta et al., 2003**). Elles sont des métallo-enzymes à calcium. Ces ions sont nécessaires au maintien de la stabilité de la structure tertiaire de l'enzyme et à son activité (**Fogarty et al., 1980**).

L'avantage majeur de l'utilisation des microorganismes pour la production des amylases est la capacité de produire à grande échelle ainsi que, la facilité de

manipulation pour obtenir des enzymes avec des caractéristiques souhaitées (**Lonsane et al., 1990**).

Les amylases sont parmi les enzymes les plus importantes en biotechnologie (**Gupta et al., 2003**). Elles représentent environ 25 à 33 % du marché mondial des enzymes (**Saxena et al., 2007**).

## 2.2. Les cellulases

Les cellulases [1,4-(1,3 ; 1,4) - $\beta$ -D-Glucanohydrolase] se rapportent à un groupe d'enzymes qui, agissant ensemble, hydrolysent la cellulose en sucres simples (**Kader et al., 1999 ; Korish, 2003**). La cellulase est l'une des principaux membres de la famille des glycosides hydrolases. C'est un système enzymatique complexe, composé de trois types principaux d'enzymes : Endo  $\beta$  (1-4) -glucanase ou endocellulase (EC 3.2.1.4), Exo  $\beta$  (1-4) - glucanase ou cellobiohydrolase (EC 3.2.1.91),  $\beta$  (1-4) -glucosidase ou cellobiase (EC 3.2.1.21) (**Xu, 2002**).

La biotechnologie des cellulases a débuté vers les années 1980 dans l'alimentation animale (**Chesson, 1987**) et ensuite dans l'industrie du textile, de la lessive et du papier, elle occupe environ 20 % du marché mondial des enzymes (**Bhat, 2000, Lekchiri et al., 2006**). Les performances élevées atteintes leurs ouvrent des perspectives intéressantes pour différentes applications industrielles (**Scriban, 1993**), dans les industries de transformation de l'amidon, de brasserie, l'extraction de jus de fruits et légumes (**Gao et al., 2008**). L'une des applications potentielles des cellulases est la production d'éthanol-carburant à partir de la biomasse lignocellulosique.

## 2.3. Les pectinases

Les enzymes pectinolytiques ou pectinases hydrolysent les substances pectiques et sont largement distribuées dans les plantes supérieures et dans les micro-organismes. Cette famille d'enzymes est capable d'attaquer une variété de liaisons chimiques des pectines.

Le terme « enzyme pectinolytique » ne concerne que les enzymes qui agissent sur la partie galacturonique des substances pectiques et les enzymes capables de dégrader les chaînes latérales ne sont pas classées parmi les enzymes pectinolytiques (**Parenicova et al., 2000 et Torres et al., 2013**).

La plupart des préparations commerciales de pectinases sont d'origine microbienne notamment fongique. Cependant, l'espèce *Aspergillus niger* est la source fongique la plus communément utilisée pour la production industrielle d'enzymes pectinolytiques (**Jayani et al., 2005 ; Dinu et al., 2007**).

#### 2.4. Les Protéases

Les protéases sont des enzymes très complexe, elles appartiennent à la classe d'hydrolases (EC 3.4.21-24.x), formées d'une ou plusieurs chaînes polypeptidiques (**Kumar et al., 2008**). Les protéases catalysent le clivage des liaisons peptidiques, elles scindent les protéines en fragments polypeptidiques, qui seront par la suite transformés sous l'influence des peptidases en leurs sous- unités constitutives, les acides aminés offrant une multitude de structures (**Frazier, 1967 ; Scriban, 1999**). La formation des enzymes protéolytiques est parfois réprimée par l'adjonction au milieu d'un hydrolysat de protéines ou d'un mélange d'acides aminés.

Les enzymes fongiques représentent 40 % du marché mondial des enzymes industrielles. Les protéases constituent les enzymes les plus importantes qui peuvent être produites par plusieurs genres fongiques tels qu'*Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Geotrichum*, *Fusarium*, *Rhizomucor*, *Endothia*, etc... (**Frazier, 1967 ; Ul-haq et al., 2003**).



# *Matériel & Méthodes*

## 1. Matériel biologique

### 1.1. Prélèvement





Les échantillons (sol et eau) utilisés dans cette étude ont été prélevés le 09 mars 2019 à GaraetTimerganine (lac d'eau douce se trouvant dans la wilaya Oum El Bouaghi), Algérie(**figure6**).



**Figure6** : Photo d'une vue générale de GaraetTimerganine prise le 09 mars 2019.

Leséchantillons ont été pris depuis4 sites différents du lac de Timerganine(**tableau 3**) (sol et eau),pour le sol, la couche des trois premiers centimètres est écartée (**Buhot, 1973 ; Mihail et Ailcorel 1987 ; Saadoune et Momani, 1997**). Cent à cent-cinquante (100-150g) du sol sont recueilli dans des flacons stériles.L'eau est prélevée dans des tubes stériles.

**Tableau 3** : Les sites de prélèvement des échantillons (sol et eau).

Wilaya	Oum El Bouaghi			
Site de prélèvement	Garaet Timerganine			
Échantillons	Sol		Eau	
	Sol humide	Sol sec		
Photos				

### 1.2. Isolement des microorganismes

La suspension mère du sol est préparée à partir de 10g de sol dissout dans 90ml d'eau physiologique stérile (**annexe 1**). Une homogénéisation de la suspension est effectuée à l'aide d'une plaque d'agitation.

Pour chaque type d'échantillon (sol et eau), une série de dilutions (10<sup>-1</sup>, 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-3</sup>, 10<sup>-4</sup>) est préparée à partir de la solution mère.

Cent microlitre de chaque dilution sont étalés sur une gélose de PDA (*Potatos Dextrose Agar*) (**annexe 2**), le milieu de culture est additionné stérilement d'un antibiotique (la gentamicine à 0.04mg/ml) et ce pour empêcher la croissance des bactéries et favoriser le développement des champignons (**Leveau et Bouix, 1993 ; Tarr, 2004**).

Après ensemencement, les boîtes de Pétri sont incubées dans une étuve à 30 °C. Des observations quotidiennes sont réalisées. Après développement des différentes souches, des repiquages successifs se font systématiquement jusqu'à obtention de colonies pures (**Guiraud, 1998**). Le repiquage s'est fait sur le même milieu de départ (PDA).

## 2. Identification de l'isolat fongique sélectionné

### 2.1. Identification des moisissures

L'identification des souches fongiques sélectionnées s'est basée sur l'étude morphologique par observation de l'aspect macroscopique et microscopique.

#### 2.1.1. Identification macroscopique

Cette observation permet de déterminer les quatre caractères culturels suivants : la vitesse de croissance, la texture, la couleur du thalle, la couleur du revers de la culture et l'odeur (**Harrigan et Mccance, 1976 ; Rinaldiet al.,1998 ; Bottonet al.,1999**).

#### 2.1.2. Identification microscopique

Pour l'identification microscopique des champignons, deux méthodes sont utilisées celles du scotch (test du drapeau) pour les cultures filamenteuses et la méthode du lactophénol-bleu de coton pour les cultures poudreuses (**Chabasseet al.,2002**).

- **Méthode de scotch**

Un petit morceau de scotch est appliqué par la face collante sur la colonie à l'aide d'une pince puis déposé sur une lame porte -objet (**Chabasseet al.,2002**).

- **Coloration par le lactophénol-bleu coton**

Un fragment de la colonie est prélevé à l'aide d'une anse de platine et déposé sur une lame porte-objet dans une goutte de colorant du lactophénol-bleu coton (**annexe 3**), recouvert d'une lamelle couvre-objet qui écrase la préparation (**Chabasseet al.,2002**).

L'observation microscopique est réalisée au microscope optique au grossissement X40 et X100. L'identification se base sur l'étude morphologique du mycélium (absence ou présence de cloisons, couleur, différenciation...) et des spores (forme, couleur, texture des parois...) (**Harrigan et Mccance, 1976 ; Oteng-Gyang, 1984 ; Guiraud, 1998**).

## 3.Mise en évidence des activités enzymatiques

### 3.1. Mise en évidence de l'activité amylolytique

Le milieu utilisé est le PDA contenant de l'amidon soluble à 1% (**annexe 4**), il est utilisé pour la mise en évidence de l'activité exo-cellulaire de l'amylase secrété par les moisissures isolées (**Tatsinkouetet al., 2005**). Les boites sont incubées à 30°C pendant 5 à 7 jours.

Après incubation, le milieu gélosé est recouvert d'une solution de lugol(**annexe 5**), pendant 30 secondes suivie d'un rinçage avec de l'eau distillée. L'eau iodée

contenant l'iode se complexe avec l'amidon présent dans le milieu et donne un précipité bleu sombre.

L'hydrolyse de l'amidon est indiquée par l'apparition d'une zone claire autour de la colonie productrice d'amylase (**Tatsinkouet *al.*, 2005**).

### **3.2. Mise en évidence de l'activité cellulolytique**

Le milieu utilisé est le carboxyméthylcellulose agar (CMC) (**annexe 4**)(**Oikawa, 1998 ; Korish, 2003**). Les boîtes sont incubées à 30°C pendant 5 à 7 jours.

Après croissance, les boîtes sont colorées avec une solution au rouge Congo (0.1%) (**annexe 5**). Ce dernier se fixe sélectivement sur les polymères de cellulose. Après 30 minutes de réaction à température ambiante, les boîtes sont lavées avec une solution de NaCl (1M) (**annexe 1**) pendant une heure. Le « rouge Congo » permet la mise en évidence de l'activité cellulolytique par l'apparition de zones claires autour des colonies productrices de cellulase (**Oikawa, 1998 ; Korish, 2003**).

### **3.3. Mise en évidence de l'activité pectinolytique**

Les souches pectinolytiques sont recherchées sur le milieu pectine agar (**annexe 4**). Après incubation à 30°C pendant 5 à 7 jours, les boîtes sont inondées par une solution aqueuse d'acétate de cuivre à 7.5% (**annexe 5**) pendant 10 minutes. L'acétate de cuivre donne une couleur bleu clair sur la gélose qui contient la pectine non dégradée (**Snaikiet *al.*, 2006**).

L'activité pectinolytique se manifeste par l'apparition d'un halo clair autour des colonies productrices.

### **3.4. Mise en évidence de l'activité protéolytique**

La gélose au lait (lait à 20% d'agar) (**annexe 4**) est utilisée pour la mise en évidence de la présence d'une activité protéolytique exo-cellulaire chez les souches fongiques (**Clarke et Steel, 1966**). L'ensemencement se fait par touche centrale et l'incubation est réalisée à 30°C pendant 5 à 7 jours. La gélose au lait est choisie pour sa richesse en protéines et la simplicité dans la préparation (**Smith *et al.*, 1952**).

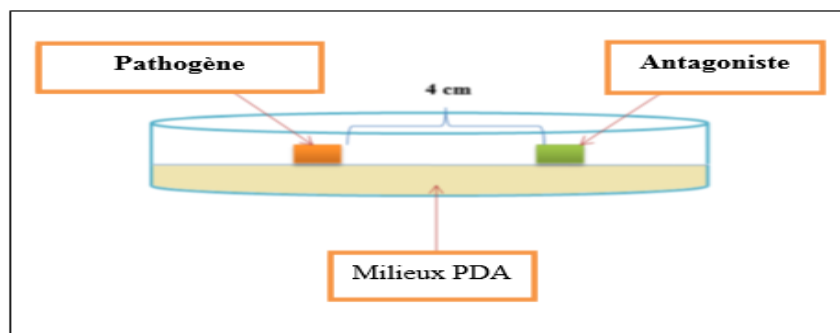
La dégradation de protéines du lait se caractérise par l'observation visuelle et directe d'une zone de lyse transparente autour de la colonie productrice de protéase (**Harrigan et Mccance, 1976**).

Une activité enzymatique est significative si le diamètre de la zone d'hydrolyse est supérieur ou égale à 3mm. Ces diamètres sont quotidiennement mesurés (jusqu'au septième jour) (Ronald et Harold, 1970).

#### 4. Test d'antagonisme

Dans cette technique nous avons utilisé la méthode de la confrontation directe appelée également la technique des cultures opposées. Elle est décrite par (Sivan et Chet, 1989) et consiste à placer de façon diamétralement opposée sur des boîtes de Pétri contenant 15 ml de milieu PDA (annexe 2), deux explants de 5 mm de diamètre, à une distance de 4 cm l'un de l'autre. Ces explants provenant des cultures de champignons (pathogène et antagoniste) (figure 7). Les repiquages sont effectués en même temps. L'incubation est réalisée à 30°C pendant 10 jours (Hibar et al., 2005). Le témoin est constitué uniquement du pathogène, repiqué au centre de la boîte de Pétri contenant le milieu PDA.

- En premier lieu, nous avons testé un antagoniste. Il s'agit de *Cladosporium cladosporioides*, une souche entomopathogène préalablement isolée et identifiée. Celle-ci est confrontée à un pathogène (nos souches isolées depuis le lac de Timerganine).
- En deuxième lieu toutes les souches isolées depuis le lac de Timerganine et identifiées ont été confrontées les unes contre les autres, afin de déterminer l'effet antagoniste de chacune. Le calcul du pourcentage d'inhibition s'est fait selon l'équation ci-dessous et la colonie la moins envahissante est prise comme témoin.



**Figure 7** : Présentation schématique de la confrontation directe.

L'évolution de la croissance mycélienne des colonies est effectuée toutes les 24 heures par la mesure des diamètres au millimètre près (Moussaoui, 2010).

Le pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne est calculé selon la formule suivante (Houniet *al.*,1996) :

$$IC\% = (DT - DPA / DT) \times 100$$

Où :

**DT** : Croissance diamétrale du témoin ;

**DPA** : Croissance diamétrale mycélienne du pathogène en présence de l'antagoniste,

**IC%** : Inhibition de la croissance.

## 5. Identification de la bactérie contaminante

Au cours de la confrontation entre les souches fongiques, une contamination par une bactérie est survenue au bout du troisième jour d'incubation. Les colonies fongiques se trouvant dans les boîtes contaminées ont présenté des zones d'inhibitions empêchant la bactérie de s'approcher, d'où l'intérêt d'identifier cette bactérie sensible probablement à une substance libérée par la moisissure.

### 5.1. Identification macroscopique

C'est une description directe faite sur boîtes d'isolement, permettant au moins une distinction des souches les unes des autres afin de les purifier. Elle permet de déterminer l'aspect macroscopique des colonies (forme, aspect, couleur, contour, taille, etc.) (Badis *et al.*, 2005). L'identification macroscopique des bactéries se fait après leur croissance sur de la gélose nutritive GN (annexe 2) à 37°C et pendant 24 h.

### 5.2. Identification microscopique

L'observation microscopique s'effectue à l'aide d'un microscope optique.

- **Observation à l'état frais**

Elle permet l'observation des bactéries vivantes et la détermination de leur morphologie, de leur mode de regroupement et de leur mobilité. La méthode consiste à déposer une goutte d'eau distillée ou d'eau physiologique stérile sur la lamelle, puis apporter et dissocier dans la goutte un prélèvement bactérien de la colonie à observer ; la lamelle est recouverte par une lame creuse de la manière à obtenir une goutte pendante et l'observation est faite à différents grossissements (X40 et X100) (Singleton, 2005).

- **Coloration de Gram**

Décrite par **Gram** en **1884**. Elle permet de distinguer deux grands groupes bactériens : les bactéries à Gram négatif, se colorent en rose et les bactéries à Gram positif, apparaissent violettes (**Berraho, 2009**). Ainsi que la précision de la morphologie et le mode de regroupement des colonies.

Sur chacune des lames dont les souches sont fixées, quelques gouttes de violet de gentiane (**annexe 5**) sont déposées et laissées agir pendant 1min. Après rinçage avec de l'eau de robinet, du lugol(**annexe 5**) est redéposé pendant 1min pour le mordantage. Ensuite, la décoloration est faite par l'alcool à 95° pendant 30secondes puis un autre rinçage est effectué. Enfin, un deuxième colorant (fuschine de Ziehl) (**annexe 5**) est déposé pendant 30secondes (**Larpent, 1990**).

Après le dernier lavage et séchage des lames, l'observation est réalisée au microscope optique (10 X 100) par l'ajout d'une goutte d'huile d'immersion.

### **5.3. Tests biochimiques**

- **Test de Catalase**

Il s'agit de la recherche de la catalase, enzyme responsable de la décomposition du peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) produit par la souche. Son principe consiste à mettre en contact une colonie de l'isolat en présence d'eau oxygénée. Une effervescence due à un dégagement gazeux traduit la présence de cette enzyme (**Joffin et Leyral, 2006 ; Tankeshwar, 2013**).

- **Test de l'Oxydase**

Le cytochrome oxydase est une enzyme qui intervient à la fin de la chaîne respiratoire. Elle permet la fixation de l'hydrogène et des électrons sur l'oxygène. Sa production est mise en évidence par des disques « Ox » imprégnés d'oxalate N-N-diméthylparaphénylène.

Une quantité suffisante de culture est déposée sur le disque imbibé d'eau distillée. Une couleur bleu violacée se manifeste en quelques minutes si la réaction est positive (**Joffin et Leyral, 2006 ; Delarras, 2014**).

- **La galerie API 20 NE**

API 20 NE est un système standardisé pour l'identification des bacilles à Gram négatif non fermentaires et non fastidieux (ex : *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Moraxella*, *Vibrio*, *Aeromonas*, etc.) combinant 8 tests conventionnels, 12 tests d'assimilation, et une base de données.



➤ **Principe**

La galerie API 20 NE comporte 20 microtubes contenant des substrats déshydratés. Les tests conventionnels sont inoculés avec une suspension bactérienne saline qui reconstitue les milieux. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs.

Les tests d'assimilation sont inoculés avec un milieu minimum et les bactéries cultivent seulement si elles sont capables d'utiliser le substrat correspondant. La lecture de ces réactions se fait à l'aide du tableau de lecture et l'identification est obtenue à l'aide du Catalogue Analytique ou d'un logiciel d'identification.

• **Les étapes de Préparation de la galerie**

Réunir fond et couvercle d'une boîte d'incubation et répartir environ 5 ml d'eau distillée ou déminéralisée dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide.

- Inscrire la référence de la souche sur la languette latérale de la boîte.
- Sortir la galerie de son emballage individuel.
- Placer la galerie dans la boîte d'incubation.

• **Préparation de l'inoculum**

- Ouvrir une ampoule d'API NaCl 0,85 % Medium (2 ml)
- À l'aide d'une pipette Pasteur, prélever 1 à 4 colonies de morphologie identique.
- Utiliser préférentiellement des cultures jeunes (18-24 heures).
- Réaliser une suspension égale à 0,5 de McFarland. Cette suspension doit être utilisée extemporanément.

• **Inoculation de la galerie**

- Remplir les tubes des tests NO<sub>3</sub> à PNPG avec la suspension précédente en utilisant la pipette ayant servi au prélèvement. Pour éviter la formation de bulles au fond des tubes, poser la pointe de la pipette sur le côté de la cupule, en inclinant légèrement la boîte d'incubation vers l'avant.
- Remplir tubes et cupules des tests GLU à PAC en veillant à créer un niveau horizontal ou légèrement convexe, mais jamais concave. Des cupules incomplètement remplies ou trop remplies peuvent entraîner des résultats incorrects.
- Remplir d'huile de paraffine les cupules des trois tests soulignés (GLU, ADH, URE) pour former un ménisque convexe.
- Refermer la boîte d'incubation et incuber à 37°C pendant 24 heures.

- **Lecture de la galerie**

- Après incubation, la lecture de la galerie doit se faire en se référant au tableau de Lecture.
- Noter sur la fiche de résultats toutes les réactions spontanées (GLU, ADH, URE, ESC, GEL, PNPG).
- La révélation des deux tests  $\text{NO}_3$  et TRP doit se faire en mettant les tests d'assimilation à l'abri d'une contamination par l'air ; pour cela, placer le couvercle de la boîte d'incubation au-dessus de ce test, pendant la période de révélation de test  $\text{NO}_3$ .

- **Test  $\text{NO}_3$**

- Ajouter une goutte de réactifs NIT 1 et NIT 2 dans la cupule  $\text{NO}_3$ .
- Après 5 min, une couleur rouge indique une réaction positive, à noter sur la fiche de résultats.
- Une réaction négative peut être due à la production d'azote (éventuellement signalée par la présence de microbulles) ; ajouter 2-3 mg de réactif Zn dans la cupule  $\text{NO}_3$ .
- Après 5 mn, une cupule restée incolore indique une réaction positive à noter sur la fiche de résultats.
- Si la cupule devient rose-rouge, la réaction est négative car les nitrates encore présents dans le tube ont alors été réduits en nitrites par le zinc. La réaction utilisée pour l'identification de la bactérie est la réduction des nitrates ; elle est positive si l'une ou l'autre des deux réactions précédentes (production de  $\text{NO}_2$  ou de  $\text{N}_2$ ) est positive.
- La production de  $\text{N}_2$  peut cependant être utilisée seule comme test complémentaire dans le Catalogue Analytique.

[www.biomerieux.com](http://www.biomerieux.com).

# *Résultats & Discussion*

## 1. Isolement des microorganismes

L'isolement des souches fongique depuis le sol humide, sol sec et l'eau dans le site d'étude a permis l'obtention de dix-huit souches de moisissures identifiées dont la distribution est illustrée dans le **tableau 4**.

**Tableau 4** : La distribution des moisissures isolées depuis les échantillons.

Échantillons Souches	L'eau	Sol humide	Sol sec
<b>S1</b>	-	+	+
<b>S2</b>	+	+	+
<b>S3</b>	+	+	+
<b>S4</b>	-	-	+
<b>S5</b>	+	-	-
<b>S6</b>	-	-	+
<b>S7</b>	+	+	+
<b>S8</b>	+	+	-
<b>S9</b>	+	-	+
<b>S10</b>	-	+	-
<b>S11</b>	-	+	+
<b>S12</b>	+	-	+
<b>S13</b>	-	+	+
<b>S14</b>	-	+	+
<b>S15</b>	-	+	+
<b>S16</b>	+	+	-
<b>S17</b>	+	+	+
<b>S18</b>	-	-	+

+ : présence de souches - : absence de souches

18 isolats fongiques ont été obtenus à partir de trois sites différents (l'eau, sol humide, sol sec) D'après le **tableau 4**, les résultats d'isolement de chaque site montrent que le sol sec est le site le plus riche (contient 14 souches) vient juste après le sol humide avec 12 souches suivie de l'eau avec 9 souches.


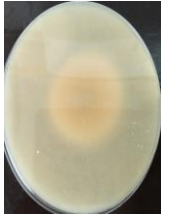


Ces résultats peuvent s'expliquer par la richesse du sol en nutriments nécessaires à la croissance microbienne par rapport à l'eau. En effet, **Jouani et Yiannicouris (2002)** signalent que la croissance fongique est régie par de nombreux paramètres physico-chimiques.

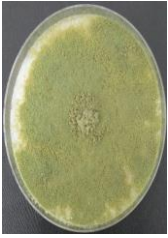
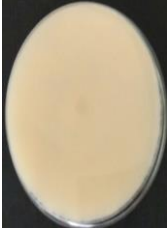
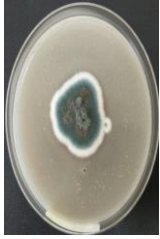
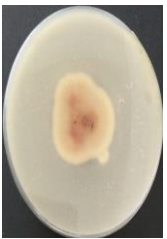

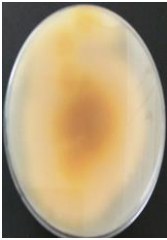
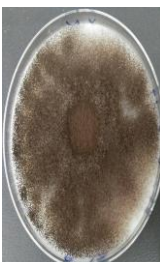

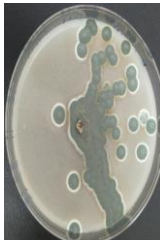
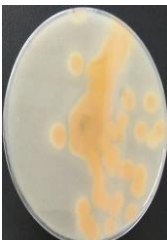
## 2. Identification des moisissures sélectionnées

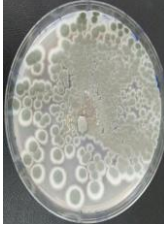
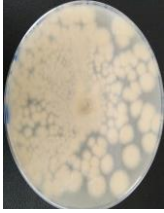

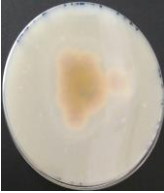
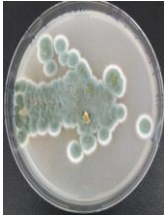








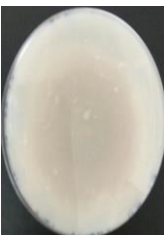
### 2.1. Identification macroscopique






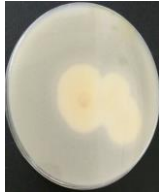
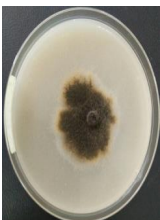
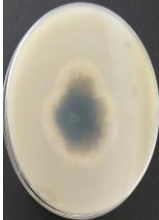
Les caractères macroscopiques des différentes souches de moisissures isolées et sélectionnées sont étudiés sur milieu gélosé PDA, l'un des milieux les plus fréquemment utilisés. Le **tableau 5** regroupe les photos de l'aspect macroscopique des mycéliums, la vitesse de croissance, la texture, la couleur du mycélium et la couleur du revers des boîtes de Pétri.

**Tableau 5 :** Observation macroscopique des colonies des moisissures sur PDA à 30 °C.

Souches	Vitesse de croissance	Couleur de face	Texture	Couleur du revers	Photos obtenues	
					Face	Revers
S1	Croissance moyenne	Blanche au début puis Beige	Duveteuse	Incolore		
S2	Croissance rapide	Blanche puis beige à brun noisette	Duveteuse	Incolore		

S3	Croissance très rapide.	Blanche au début puis jaune puis vert-jaune.	Granuleuse	Incolore		
S4	Croissance lente.	Blanche au début puis verte avec contour blanc.	Veloutée	Incolore ou jaune au brun rougeâtre		
S5	Croissance rapide	Blanche au début puis jaune	Duveteuse	Jaune		
S6	Croissance rapide	Blanche au début puis jaune et à maturité, les colonies deviennent noires.	Granuleuse envahissante	Incolore		
S7	Croissance moyenne	Verte avec contour blanc	Poudreuseuse	Jaune foncé		

S8	Croissance moyenne	Brune verdâtre avec contour blanc	Veloutée à Poudreuse	Incolore		
S9	Croissance moyenne	Verte avec contour blanc	Veloutée à Poudreuse	Jaune		
S10	Croissance moyenne	Verte avec contour blanc	Veloutée à poudreuse	Jaune		
S11	Croissance rapide	Blanche	Cotonneuse	Pourpre		
S12	Croissance très rapide	Blanche	Cotonneuse	Pâle		
S13	Croissance très rapide	Blanche	Filamenteuse	Noire		
S14	Croissance rapide	Brune a vert olive	Duveteuse à laineuse	Incolore		





S15	Croissance moyenne	Blanche Jaunâtre	Laineuse	Jaune		
S16	Croissance rapide	Crevette	Duveteuse à poudreuse	Crevette		
S17	Croissance moyenne	Blanche	Duveteuse à poudreuse	Incolore		
S18	Croissance rapide	Blanche grise au départ et devient rapidement foncé	Duveteuse à laineuse	Foncé		


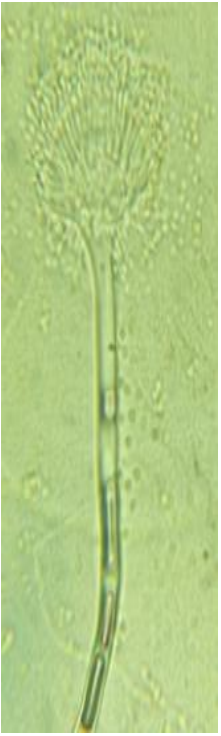

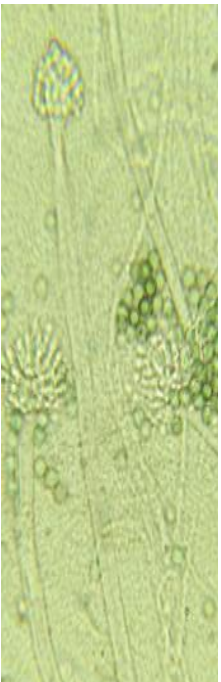
## 2.2. Identification microscopique




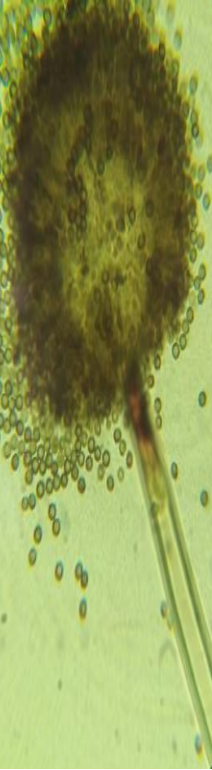
L'étude microscopique permet de compléter les informations fournies par les observations macroscopiques. Elle porte sur l'observation des structures caractéristiques des souches fongiques isolées (Conidiophores, conidies, mycélium etc.) (**tableau 6**). Les résultats observés ont permis de noter neuf genres de moisissures (*Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Chaetomium*, *Verticillium*, *Ascochyta*, *Absidia*, *Alternaria*).


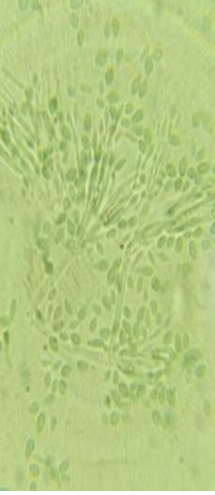

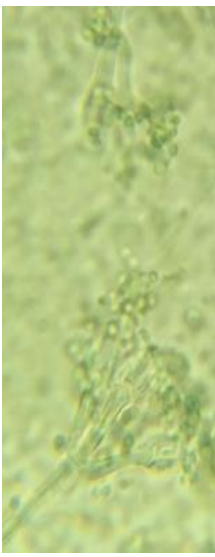





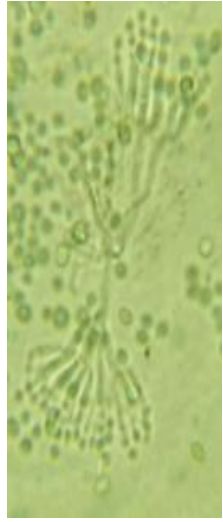



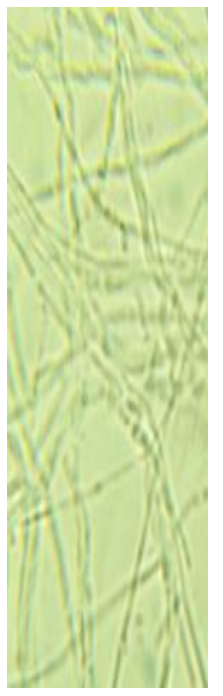
**Tableau 6 :** Observation microscopique des moisissures isolées.


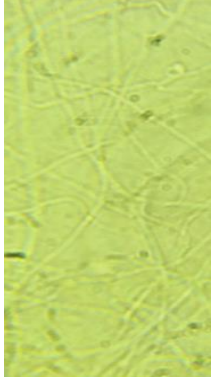


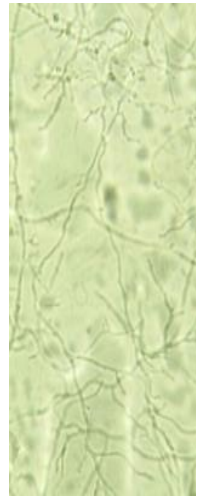
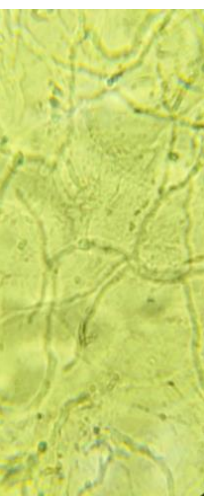
Souches	Description	Genre	Photos obtenus	
			Grossissement x 40	Grossissement x 100
S1	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Filament septé.</li> <li>- Conidiophore court, lisse et incolore.</li> <li>- Phialides directement portées par la vésicule, dressées, densément groupées.</li> <li>- Conidies globuleuses, vertes, échinulées, petites.</li> <li>- Tête aspergillaire unisériée en colonne compacte, assez grande.</li> </ul>	<i>Aspergillus sp.1</i>		
S2	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Filament septé.</li> <li>- Conidiophore court, lisse et incolore.</li> <li>- Phialides directement portées par la vésicule, dressées, densément groupées.</li> <li>- Conidies globuleuses, -Vertes, échinulée, petite.</li> <li>- Tête aspergillaire unisériée en colonne compacte, assez grande.</li> </ul>	<i>Aspergillus sp.2</i>		

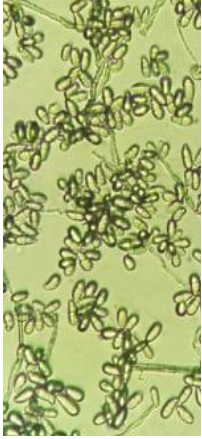



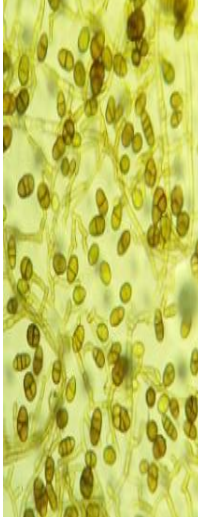
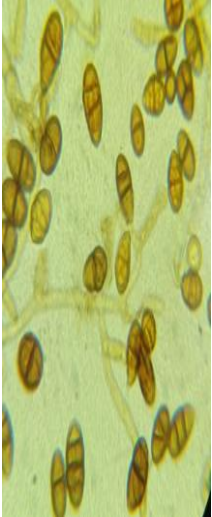
<p>S3</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Filament septé.</li> <li>- Conidiophore court, lisse et incolore.</li> <li>- Phialides directement portées par la vésicule, dressées, densément groupées.</li> <li>- Conidies globuleuses, vertes, échinulées, petites.</li> <li>- Tête aspergillaire unisériée en colonne compacte, assez grande.</li> </ul>	<p><i>Aspergillus sp.3</i></p>		
<p>S4</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Filament septé.</li> <li>- Conidiophore court, lisse et incolore.</li> <li>- Phialides directement portées par la vésicule, dressées, densément groupées.</li> <li>- Conidies globuleuses, vertes, échinulées, petites.</li> <li>- Tête aspergillaire unisériée en colonne compacte.</li> </ul>	<p><i>Aspergillus sp.4</i></p>		

<p>S5</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Filament septé.</li> <li>- Conidiophore court, lisse et incolore.</li> <li>- Phialides directement portées par la vésicule, dressée, densément groupées.</li> <li>- Conidies globuleuses, vertes, échinulées, petites.</li> <li>- Tête aspergillaire unisériée en colonne compacte, assez grande.</li> </ul>	<p><i>Aspergillus sp.5</i></p>		
<p>S6</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Conidiophore lisse, très long.</li> <li>- Vésicule globuleuse.</li> <li>- Phialides insérées sur la vésicule par l'intermédiaire de métules disposées surtout le pourtour de la vésicule.</li> <li>- Conidies globuleuses, brun.</li> <li>- Tête aspergillaire bisériée radiée, noire à maturité.</li> </ul>	<p><i>Aspergillus niger</i></p>		

<p>S7</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Hyphe septé.</li> <li>- Conidiophore isolé.</li> <li>- Pénicilles constitués de phialides branchés directement à l'extrémité du conidiophore.</li> <li>- Phialides en forme de verticilles.</li> <li>- Présence de métules.</li> </ul>	<p><i>Penicillium sp.1</i></p>		
<p>S8</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Hyphe septé.</li> <li>- Conidiophore isolé.</li> <li>- Pénicilles constitués de phialides branchés directement à l'extrémité du conidiophore.</li> <li>- Phialides en forme de verticilles.</li> <li>- Présence de métules.</li> </ul>	<p><i>Penicillium sp.2</i></p>		
<p>S9</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Hyphe septé.</li> <li>- Conidiophore isolé.</li> <li>- Pénicilles constitués de phialides branchés directement à l'extrémité du conidiophore.</li> <li>- Phialides en forme de verticilles.</li> <li>- Présence de métules.</li> </ul>	<p><i>Penicillium sp.3</i></p>		

<p>S10</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Hyphe septé.</li> <li>- Conidiophore isolé.</li> <li>- Pénicilles constitués de phialides branchés directement à l'extrémité du conidiophore.</li> <li>- Phialides en forme de verticilles.</li> <li>- Présence de métules.</li> </ul>	<p><i>Penicillium sp.4</i></p>		
<p>S11</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Hyphes septée fin.</li> <li>- Conidiophore simple ou verticillé, court.</li> <li>- Macroconidies fusiformes, pluri-septées.</li> <li>- Pas de chlamydospores.</li> </ul>	<p><i>Fusarium sp.</i></p>		
<p>S12</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Les conidiophores : sont simples ou disposés en verticilles ; ils portent de longues mono phialides d'aspect cylindrique.</li> <li>-Microconidies : Uni-cellulaires ou bicellulaires disposées en « fausses têtes » ou glissant le long des phialides.</li> <li>-Macro-conidies : fusiformes et</li> </ul>	<p><i>Fusarium solani</i></p>		

	<p>cloisonnées.</p> <p>-Les chlamydoespores, sont présentes en position terminale.</p>			
S13	<p>- Mycélium cloisonné.</p> <p>- Présence des angles (90°).</p> <p>- Absence des spores.</p>	<b><i>Rhizoctonia sp.</i></b>		
S14	<p>-Périthèces globuleux ou subglobuleux, brune olivacée.</p> <p>-sans col différencié.</p> <p>-Ascospores unisériées.</p> <p>-Asque cylindrique.</p>	<b><i>Chaetomium sp</i></b>		
S15	<p>- Les conidiophores : Sont dressée, hyalins ou noir portant des masses de spores verticillées.</p> <p>-Phialides alternes, opposées ou simple.</p> <p>-Chlamydoespores brun pâle, subglobuleux.</p>	<b><i>Verticillium sp</i></b>		

<p>S16</p>	<p>-Présence de pycnidiospores à l'intérieur des pycnides.</p>	<p><i>Ascochyta sp</i></p>		
<p>S17</p>	<p>-filament large peu ou pas septes. -sporocytophores isolés ou groupés, fixés au milieu des stolons et ramifiés en grappe ou en corymbe. Ils se terminent par une large apophyse conique. -chlamydospores absentes ou peu nombreuses. -spores cylindriques lisses, jaunâtres.</p>	<p><i>Absidia sp</i></p>		
<p>S18</p>	<p>-Filaments : septés, fin et régulier bruns foncés à noirs. -Conidies pluricellulaires en chaînes brunes irrégulières. -Spores à paroi lisse sont souvent disposées en chaînes.</p>	<p><i>Alternaria sp</i></p>		

L'identification des genres fongiques a été réalisée essentiellement selon les clefs de détermination de (Botton, 1990 ; Guiraud, 1998 ; Leyral *et al.*, 1998) ainsi que le catalogue « les moisissures d'intérêt médical (Chabasse *et al.*, 2002). Et « *soil and fungi* » (Domsch *et al.*,1980).

- En comparant les observations macroscopiques et microscopiques avec la bibliographie, neuf genres de moisissures ont été identifiés (figure 8). Il s'agit de : *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Chaetomium*, *Verticillium*, *Ascochyta*, *Absidia* et *Alternaria*. D'après (Botton *et al.* (1990), Morin. (1994), Lavarde *et al.* (2006) et Blancard. (2014) certains de ces genres sont phytopathogènes, c'est le cas par exemple de *Rhizoctonia sp*, *Verticillium sp*, *Ascochyta sp* et d'autres sont pathogènes pour l'homme, les animaux et les végétaux et susceptibles de produire des métabolites toxique (*Aspergillus sp*, *Fusarium sp*).

### 3. Analyse statistique

Les résultats obtenus montrent l'existence d'une flore fongique plus ou moins variée. En effet sur les neuf genres identifiés (*Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Chaetomium*, *Verticillium*, *Ascochyta*, *Absidia*, *Alternaria*), une dominance du genre *Aspergillus* avec 33 % du total des souches isolées, suivi de *Penicillium* avec 22 % suivi de *Fusarium* avec 11 % et enfin *Rhizoctonia*, *Chaetomium*, *Verticillium*, *Ascochyta*, *Absidia*, *Alternaria* avec un pourcentage de 5 à 6 % (figure 8) .

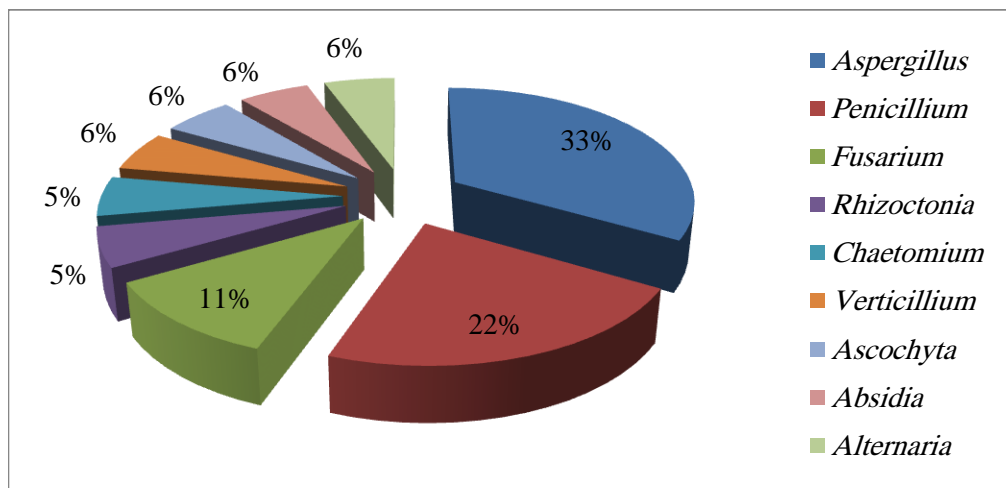



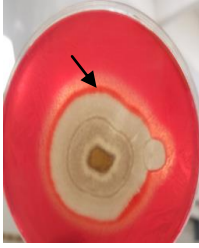

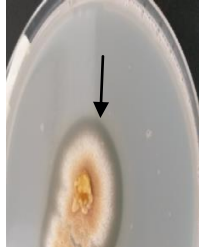
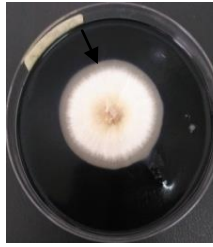
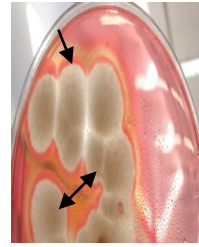

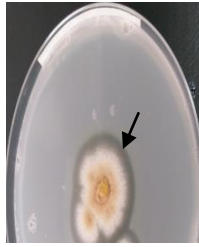


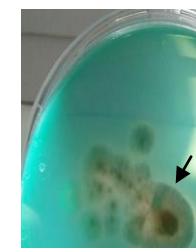

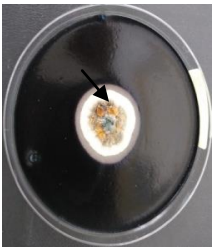


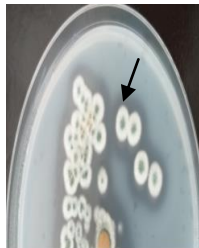
Figure 8 : Pourcentage des genres de moisissures identifiées.

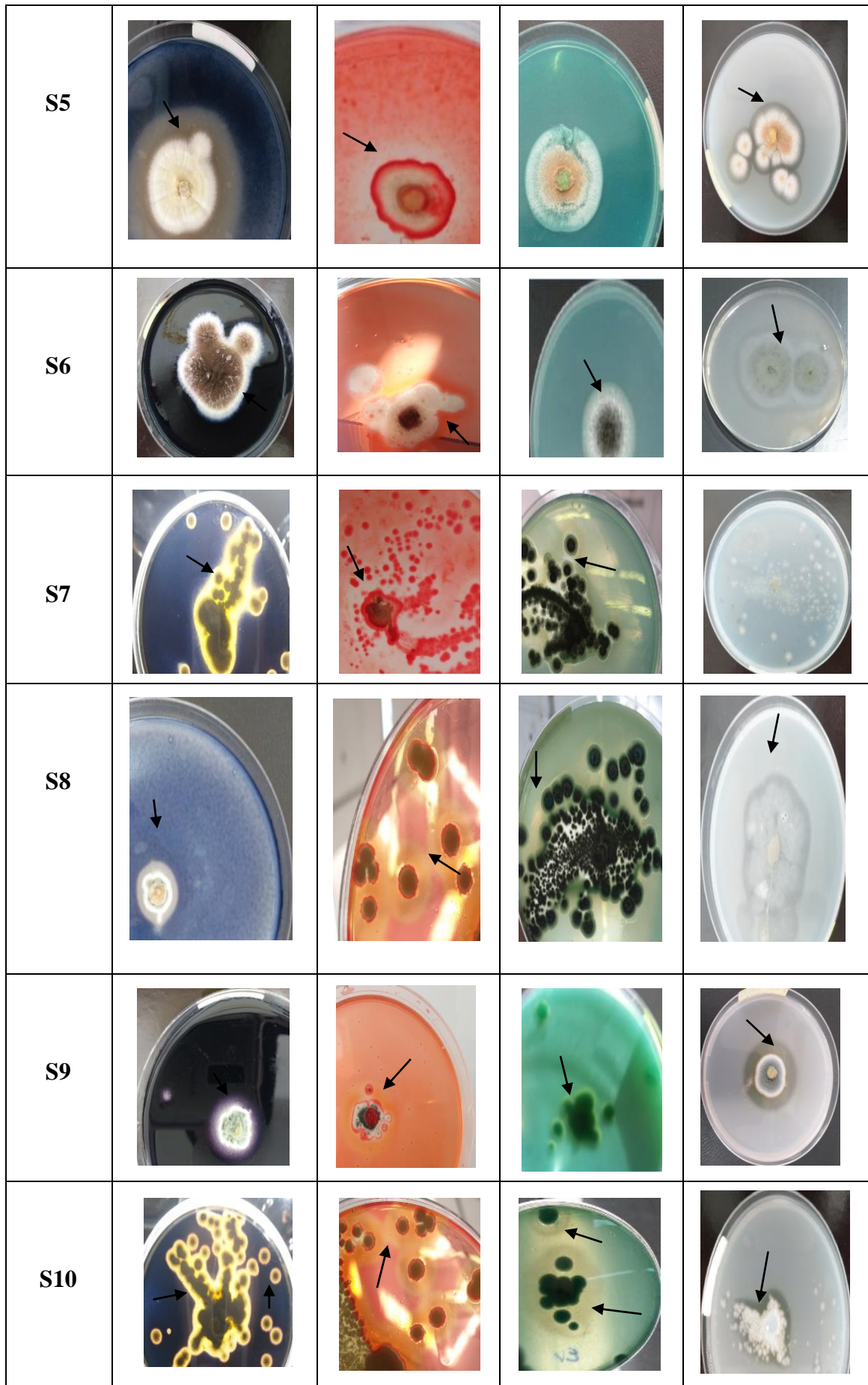


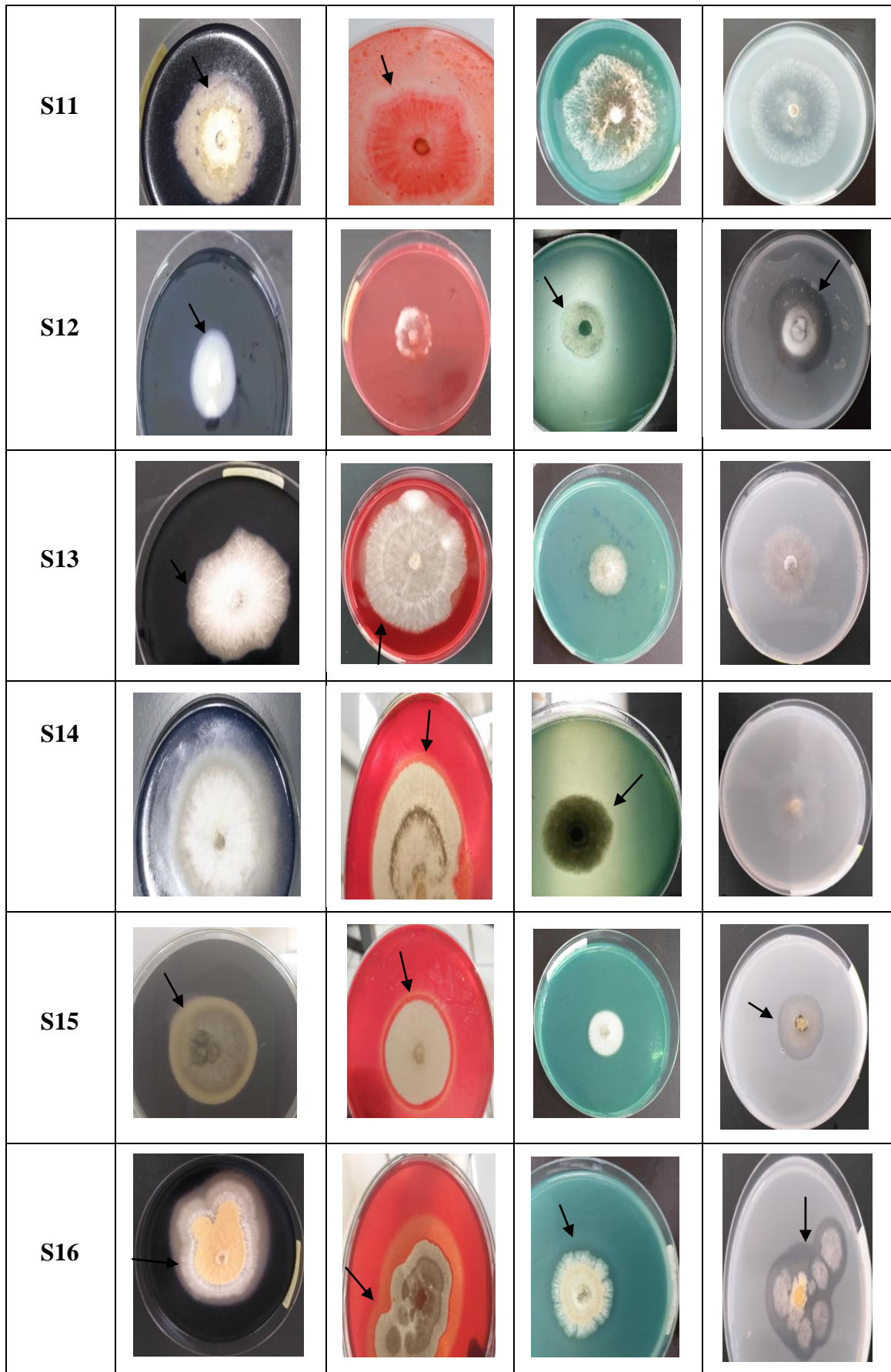
#### 4. Mise en évidence des activités enzymatiques des moisissures

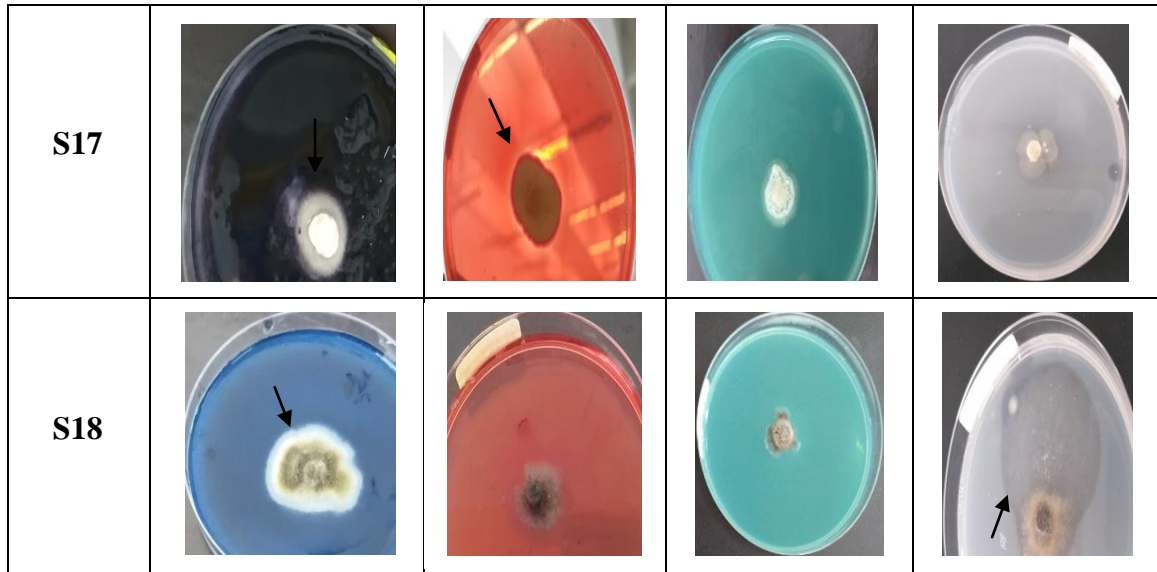
La mise en évidence de l'activité enzymatique est recherchée sur un milieu de culture solide. En effet, le choix de ce dernier et le substrat inducteur est déterminant. Pour cela, on a utilisé les milieux gélosés : PDA à amidon à 1%, CMC-agar, pectine-agar et gélose au lait à 20% d'agar comme milieux sélectifs pour la détection des activités : amylolytique, cellulolytique, pectinolytique et protéolytique respectivement. Les dix-huit souches des moisissures isolées sont testées et les résultats obtenus après 5 jours d'incubation à 30°C sont regroupés dans le **tableau 7**.

**Tableau 7 :** Zones d'hydrolyses de souches des moisissures testées après cinq jours d'incubation.

Souches	Amylase	Cellulase	Pectinase	Protéase
S1				
S2				
S3				
S4				







Les résultats obtenus après l'ensemencement des milieux gélosés et après incubation à 30 °C pendant 5 jours, donnent des zones d'hydrolyse de diamètres différents suivant la capacité de chaque souche à dégrader le substrat disponible dans le milieu (**tableau 8**).

**Tableau 8 :** Diamètre (mm) de zones d'hydrolyse des souches fongiques testées après cinq jours incubation à 30 °C.

Souches	Diamètre (mm) des zones d'hydrolyse			
	Amylase	Cellulase	Pectinase	Protéase
<b>S1</b>	12	8	/	7
<b>S2</b>	9	5	2	5
<b>S3</b>	6	2	1	*
<b>S4</b>	7	10	/	8
<b>S5</b>	10	12	/	5
<b>S6</b>	6	2	5	10
<b>S7</b>	10	3	7	/
<b>S8</b>	5	10	6	5
<b>S9</b>	6	2	3	14
<b>S10</b>	10	7	10	4
<b>S11</b>	15	5	/	/
<b>S12</b>	4	/	2	18
<b>S13</b>	12	1	/	/

<b>S14</b>	20	3	2	/
<b>S15</b>	10	7	/	4
<b>S16</b>	9	27	5	12
<b>S17</b>	7	2	/	/
<b>S18</b>	5	/	/	5

/ : Absence de la zone d'hydrolyse. \* : Envahissement.

#### 4.1. Activité amylolytique

Tous les isolats obtenus ont développé des zones d'hydrolyses (halo claire) entre 4 et 20 mm de diamètres (**tableau 8**). La souche S14 (*Chaetomium sp*) a présentée l'activité d'hydrolytique la plus importante par rapport aux autres souches avec un diamètre de 20 mm. Cela indique la forte capacité de celle-ci à hydrolyser l'amidon contenu dans le milieu.

En effet, plusieurs espèces du genre *Chaetomium* isolées du sol ont montrés une importante activité amylolytique c'est le cas par exemple de *Chaetomium globsum* (**Dhruba et Shukla, 2008**).

#### 4.2. Activité cellulolytique

Les souches cellulolytiques sont reconnues par la formation d'un halo transparent autour des colonies, indiquant la production de la cellulase et donc la capacité des moisissures à assimiler la cellulose.

D'après nos résultats, nous avons remarqué qu'il y a dix-sept souches possédant une activité cellulolytique. Sachant que, onze souches présentent une activité intéressante ( $\Phi$  halo  $\geq$  3 mm) (**tableau8**).

Plusieurs travaux ont été menés sur des souches fongiques cellulolytiques, les plus étudiées sont : *Aspergillus* (**Kitamoto et al., 1996 ; Lokington Kelly, 1997 ; Riou et al., 1998 ; Fujita et al., 2002**), *Penicillium* et différentes espèces de *Trichoderma* (**Petersson et al., 1981 ; Neiss et Montene court, 1984 ; Kubicek et Penttilä, 1998 ; Takashima et al., 1999 ; Nogawa et al., 2001**).

#### 4.3. Activité pectinolytique

Les résultats de la mise en évidence de l'activité pectinolytique par les souches de moisissures étudiées ont prouvés la production de la pectinase par l'apparition d'une zone transparente autour des colonies.

D'après les résultats obtenus, dix souches (S2, S3, S6, S7, S8, S9, S10, S12, S14, S16) ont développé des zones d'hydrolyses (halo claire) de différents diamètres, la souche S10 (*Penicillium sp.4*) a présenté la plus importante activité pectinolytique par rapport aux autres souches avec un diamètre de 10 mm suivi par S7 (*Penicillium sp.1*) ( $\Phi = 7$  mm) suivi de S8 (*Penicillium sp.2*) ( $\Phi = 6$  mm) puis S6 (*Aspergillus niger*) et S16 (*Ascochyta sp*) avec 5 mm de diamètre. Vient après les souches S2 (*Aspergillus sp.2*), S9 (*Penicillium sp.3*) et S14 (*Chaetomium sp*) avec 2 mm de diamètre. Enfin S3 (*Aspergillus sp.3*) qui a présenté l'activité pectinolytique la plus réduite ( $\Phi = 1$  mm). Le reste des souches n'ont montré aucune activité pectinolytique. En effet, l'étude réalisée par **Meziani et Mahcen (2017)** montre la production de pectinase par *Penicillium sp* avec un diamètre de la zone de lyse de 7.6 mm et *Aspergillus terreus* a présenté un diamètre égal à 3.8 mm.

#### 4.4. Activité protéolytique

Les résultats obtenus après ensemencement des isolats sur milieu sélectif (lait gélosé à 20 % d'agar) ont permis la sélection de treize souches ayant une activité protéolytique parmi les dix-huit souches testées. La présence d'une activité protéolytique se traduit clairement par la formation d'un halo transparent autour des colonies, résultant de la dégradation des protéines du lait du milieu par l'exo protéase produite (plus le halo est grand, plus la quantité d'enzyme produite est importante).

Des travaux de recherche réalisés dans le but de produire des protéases à partir de moisissures ont permis de mettre en évidence la capacité d'*Aspergillus oryzae* à produire et de manière significative des protéases sur des milieux bon marché (**Belmessikh et al., 2012 ; Benkahoul et al., 2017**).

Il est à noter que même en absence d'une activité protéolytique exo-cellulaire, nous avons observé un envahissement du milieu, comme c'est le cas chez S10 (*Penicillium sp.4*). Ceci indique une utilisation des sucres totaux présents dans le lait comme source de carbone et d'énergie, ou par la production d'une activité protéolytique endo-cellulaire (**Debananda et al, 2009**).

En conclusion, les résultats du **tableau 8** montrent clairement la capacité de chaque souche isolée et testées à hydrolyser ou à dégrader au moins un des substrats utilisés à savoir : l'amidon, le CMC, la pectine et la caséine du lait écrémé.



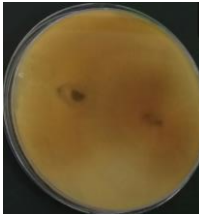









Les résultats dans le **tableau 8** notent que les sept souches (S2, S3, S6, S8, S9, S10, et S16) possèdent les quatre activités enzymatiques testées (amylolytique,




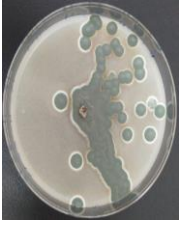


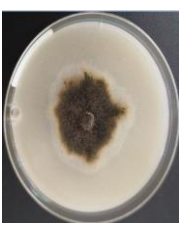

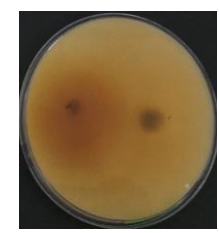




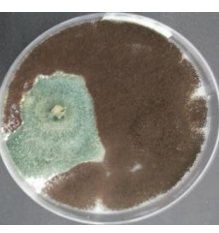
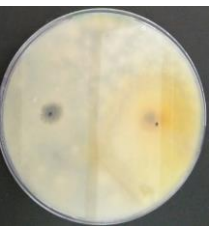
cellulolytique, pectinolytique et protéolytique), les autres souches possèdent entre trois et deux activités enzymatiques.

### 5. Teste d'antagonisme

Les résultats de test d'antagonisme de *Cladosporium cladosporioides* vis-à-vis des isolats fongiques (*Rhizoctonia sp*, *Chaetomium sp*, *Verticillium sp*, *Aspergillus sp*, *Ascochyta sp*, *Absidia sp*, *Penicillium sp*, *Alternaria sp*, *Fusarium solani*, *Aspergillus niger*) sont mentionnés dans le (tableau 9). Ces résultats montrent une réduction moyenne de la croissance mycélienne des colonies des isolats étudiés confronté à *Cladosporium cladosporioides* par rapport au témoin.

**Tableau 9 :** Pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne des souches isolées par : *Cladosporium cladosporioides* cas de confrontation directe.

Isolat	Témoin	Résultats de test d'antagonisme		Pourcentage d'inhibition
		Surface	Révère	
<i>Rhizoctonia sp</i>				90,78 %
<i>Chaetomium sp</i>				82,25 %
<i>Verticillium sp</i>				72,23 %
<i>Ascochyta sp</i>				72,61 %

<i>Absidia</i> <i>sp</i>				65 %
<i>Penicillium</i> <i>sp</i>				62,47 %
<i>Alternaria</i> <i>sp</i>				74,75 %
<i>Fusarium</i> <i>solani</i>				62,58 %
<i>Aspergillus</i> <i>niger</i>				21,17 %

Les résultats (**tableau 9**) montrent qu'au bout de dix jours d'incubation à 30 °C, la boîte est totalement envahie par l'antagoniste étudiée suivi par un arrêt de croissance du pathogène. Ces résultats sont confirmés par le calcul du taux d'inhibition en se basant sur les diamètres des colonies mesurés au quotidien.

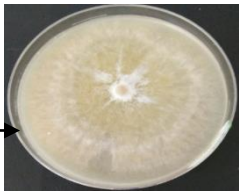

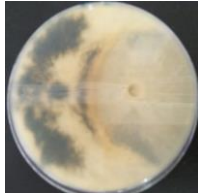
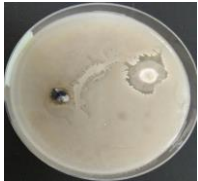
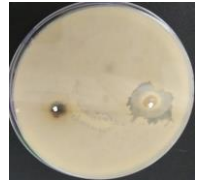


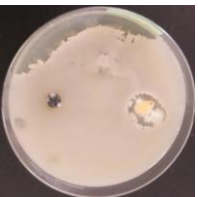
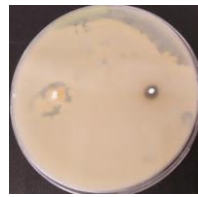
D'autre part, une action inhibitrice a été observée par *Aspergillus niger* vis-à-vis de la croissance mycélienne de *Cladosporium cladosporioides*. Nos résultats sont en accord avec des études menées par **Seidl et al. (2006)** concernant la confrontation d'*Aspergillus niger* avec d'autres souches fongiques. En effet, ce résultat pourrait s'expliquer par la production des xylanases.







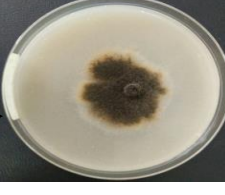






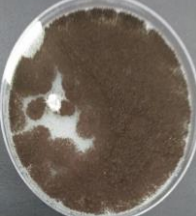


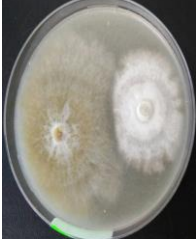












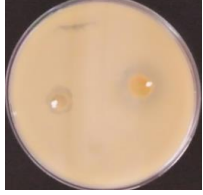
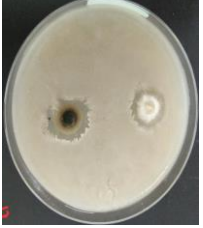
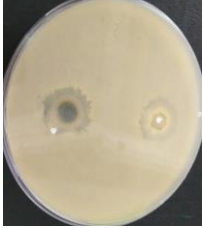




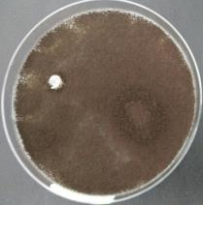



Dans la perspective d'élaborer de nouvelles méthodes de biocontrôle, l'utilisation d'espèce saprophytes se développant plus rapidement que l'espèce pathogène est prometteuse. En effet, le biocontrôle de nature fongique limiterait l'agent pathogène, l'empêchant ainsi d'atteindre le stade de développement nécessaire pour l'expression du pouvoir pathogène. D'après la bibliographie *Cladosporium cladosporoides* est capable de limiter la croissance de champignons tels que *Sclerotia sclerotinium* sur le pois (Boland et Hunter, 1988). Les résultats de David et al. (2017) indiquent que *Cladosporium cladosporoides* avait le potentiel d'un antagoniste fongique contre *Puccinia Horiana*, l'agent causal de la rouille blanche du chrysanthème. En effet, *Cladosporium cladosporoides* est considéré comme un agent de lutte biologique.

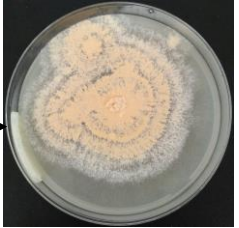





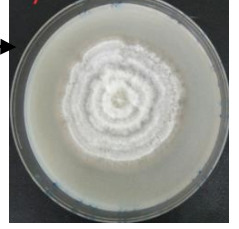

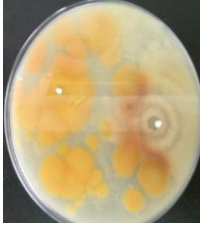
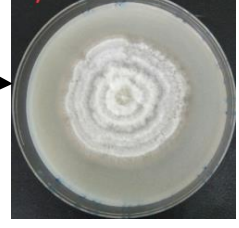
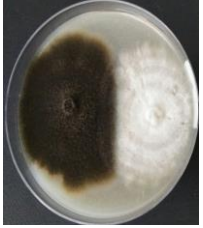


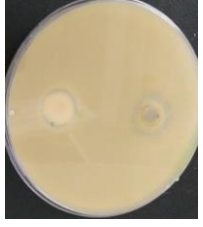


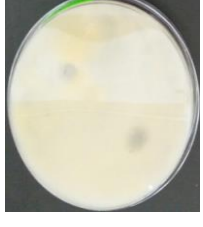



Dans cette étude nous avons testé l'activité antifongique de 10 souches de moisissures parmi 18 isolats représentant les genres : *Rhizoctonia*, *Chaetomium*, *Verticillium*, *Aspergillus*, *Ascochyta*, *Absidia*, *Penicillium*, *Alternaria*, *Fusarium solani*, *Aspergillus niger*. Les résultats de la confrontation directe entre les dix souches de champignons isolées sont représentés dans le (tableau 10).




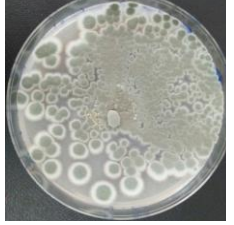


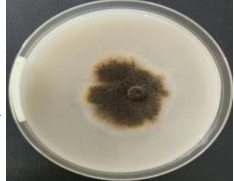
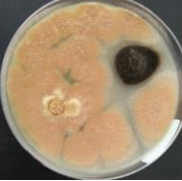



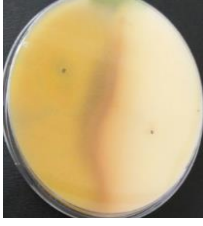
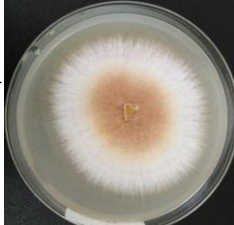

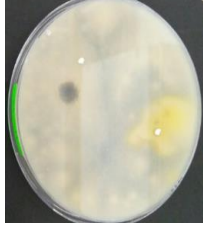






Tableau 10 : Test d'antagonisme des isolats fongique entre eux.

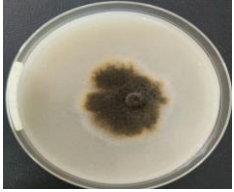







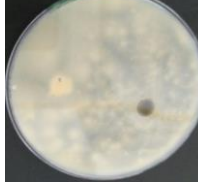

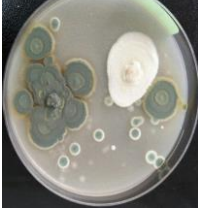



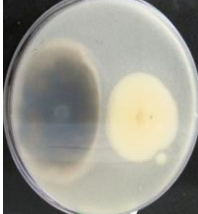




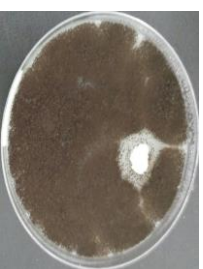
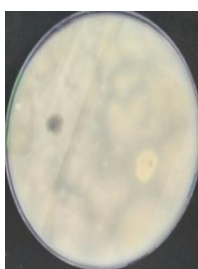
Isolats	Témoin	Résultats d'antagonismes		Pourcentages d'inhibition
		Surface	Revers	
<i>Rhizoctonia sp</i> vs <i>Chaetomium sp</i>				30,26 %
<i>Rhizoctonia sp</i> vs <i>Verticillium sp</i>	/			Présence d'une contamination bactérienne
<i>Rhizoctonia sp</i> vs <i>Aspergillus sp</i>	/			/
<i>Rhizoctonia sp</i> vs <i>Ascochyta sp</i>	/			/

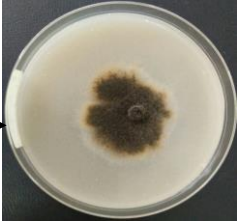






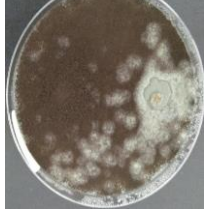
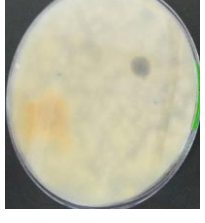
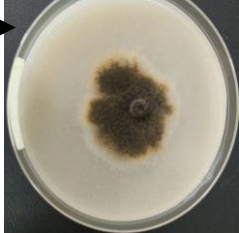
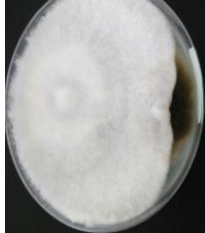
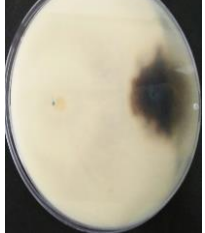
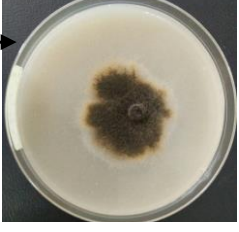



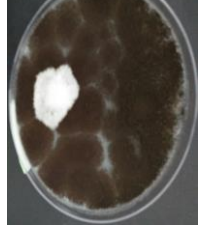

<p><i>Rhizoctonia sp</i> vs <i>Absidia sp</i></p>				<p>37,56 %</p>
<p><i>Rhizoctonia sp</i> vs <i>Penicillium sp</i></p>				<p>50%</p>
<p><i>Rhizoctonia sp</i> vs <i>Alternaria sp</i></p>				<p>20,68 %</p>
<p><i>Rhizoctonia sp</i> vs <i>Fusarium solani</i></p>				<p>63,15 %</p>
<p><i>Rhizoctonia sp</i> vs <i>Aspergillus niger</i></p>				<p>90,78 %</p>
<p><i>Chaetomium sp</i> vs <i>Verticillium sp</i></p>				<p>17,74 %</p>
<p><i>Chaetomium sp</i> vs <i>Aspergillus sp</i></p>	<p>/</p>			<p>Contamination bactérienne</p>

<p><i>Chaetomium sp</i> vs <i>Ascochyta sp</i> →</p>				<p><b>18,46 %</b></p>
<p><i>Chaetomium sp</i> vs <i>Absidia sp</i> →</p>				<p><b>31,81 %</b></p>
<p><i>Chaetomium sp</i> vs <i>Penicillium sp</i></p>	<p>/</p>			<p>Contamination bactérienne</p>
<p><i>Chaetomium sp</i> vs <i>Alternaria sp</i></p>	<p>/</p>			<p>Contamination bactérienne</p>
<p><i>Chaetomium sp</i> → vs <i>Fusarium solani</i></p>				<p><b>50,58 %</b></p>
<p><i>Chaetomium sp</i> → vs <i>Aspergillus niger</i></p>				<p><b>90,23 %</b></p>
<p><i>Verticillium sp</i> vs <i>Aspergillus sp</i></p>	<p>/</p>			<p>Contamination bactérienne</p>

<p><i>Verticillium sp</i> vs <i>Ascochyta sp</i> →</p>				<p>25 %</p>
<p><i>Verticillium sp</i> vs <i>Absidia sp</i> →</p>				<p>22,72 %</p>
<p><i>Verticillium sp</i> vs <i>Penicillium sp</i> →</p>				<p>61,17 %</p>
<p><i>Verticillium sp</i> vs <i>Alternaria sp</i> →</p>				<p>21,80 %</p>
<p><i>Verticillium sp</i> vs <i>Fusarium solani</i></p>	<p>/</p>			<p>Contamination bactérienne</p>
<p><i>Verticillium sp</i> vs <i>Aspergillus niger</i> →</p>				<p>90,25 %</p>
<p><i>Aspergillus sp</i> vs <i>Ascochyta sp</i> →</p>				<p>30%</p>

<p><i>Aspergillus sp</i> vs <i>Absidia sp</i> →</p>				<p>27,27 %</p>
<p><i>Aspergillus sp</i> vs <i>Penicillium sp</i> →</p>				<p>50,58 %</p>
<p><i>Aspergillus sp</i> vs <i>Alternaria sp</i> →</p>				<p>40,49 %</p>
<p><i>Aspergillus sp</i> vs <i>Fusarium solani</i> →</p>				<p>60,52 %</p>
<p><i>Aspergillus sp</i> vs <i>Aspergillus niger</i> →</p>				<p>70,36 %</p>
<p><i>Ascochyta sp</i> vs <i>Absidia sp</i> →</p>				<p>37,72 %</p>
<p><i>Ascochyta sp</i> vs <i>Penicillium sp</i> →</p>				<p>49,11 %</p>

<p><i>Ascochyta sp</i> vs <i>Alternaria sp</i> →</p>				<p><b>31,03 %</b></p>
<p><i>Ascochyta sp</i> vs <i>Fusarium solani</i> →</p>				<p><b>65,34 %</b></p>
<p><i>Ascochyta sp</i> + <i>Aspergillus niger</i> →</p>				<p><b>90,13 %</b></p>
<p><i>Absidia sp</i> vs <i>Penicillium sp</i> →</p>				<p><b>51,03 %</b></p>
<p><i>Absidia sp</i> vs <i>Alternaria sp</i> →</p>				<p><b>55%</b></p>
<p><i>Absidia sp</i> vs <i>Fusarium solani</i> →</p>				<p><b>54,54 %</b></p>
<p><i>Absidia sp</i> vs <i>Aspergillus niger</i> →</p>				<p><b>75 %</b></p>

<p><i>Penicillium sp</i> vs <i>Alternaria sp</i></p>				<p>65,51 %</p>
<p><i>Penicillium sp</i> vs <i>Fusarium solani</i></p>				<p>55,29 %</p>
<p><i>Penicillium sp</i> vs <i>Aspergillus niger</i></p>				<p>75 %</p>
<p><i>Alternaria sp</i> vs <i>Fusarium solani</i></p>				<p>76,75 %</p>
<p><i>Alternaria sp</i> vs <i>Aspergillus niger</i></p>				<p>90,47 %</p>
<p><i>Fusarium solani</i> vs <i>Aspergillus niger</i></p>				<p>82,75 %</p>

Vs : contre

Les résultats obtenus dans le (**tableau 10**) montrent qu'il y a différents effets d'antagonisme exercés par les isolats testés. L'effet négligeable de (17,74 % à 49,11 %), l'effet modéré entre 50 % et 65 %. Par contre *Aspergillus niger* présente un effet d'inhibition très considérable vis-à-vis tous les isolats fongiques testés (*Rhizoctonia sp*, *Chaetomium sp*, *Verticillium sp*, *Aspergillus sp*, *Ascochyta sp*, *Absidia sp*, *Penicillium sp*, *Alternaria sp*, *Fusarium solani*).

Nos résultats sont en accord avec des études menées par **Smith et Pateman (1977)** dans le cas de la confrontation avec l'agent antagoniste *Aspergillus niger*.

Plusieurs champignons du genre *Fusarium* sont aussi capable d'inhiber la croissance de plusieurs pathogènes chez le coton (**Zhanag et al., 2014**).

Par ailleurs, de nombreux cas de contrôles des maladies fongiques par parasitisme des agents pathogènes par d'autres souches fongiques sont connus. C'est par exemple le cas des souches appartenant aussi au genre *Penicillium*, qui ont la capacité de parasiter *Alternaria brassicicola* (**Vannaci et Harman, 1987**). Dans ce cas, les hyphes de l'espèce parasite pénètrent les hyphes de l'hôte, permettant ainsi la ponction des nutriments (**Hih, 1977 ; Alabouvette et al., 2009**).

En conclusion, il est connu que de nombreux champignons produisent des composés ayant des propriétés pouvant interférer avec la croissance et l'activité d'autres champignons (**Islam et al., 2005 ; Laclere et al., 2005**). Par exemple, il a été montré que *Chaetomium globosum* produit des composés antifongiques (**Vannacci et Harman, 1987**).

Durant les manipulations pour le test de l'antagonisme, une contamination bactérienne a été observée avec présence de zones d'inhibition autour des colonies fongiques indiquant la sécrétion extracellulaire d'une molécule capable de freiner la croissance de cette bactérie (**tableau 11**). En effet, d'après **Botton et al. (1990)**, beaucoup de moisissures sont connues pour leur production de substances à effet antibactérien, il s'agit de métabolites secondaires biologiquement actifs, synthétisés en fin de croissance et possédant des structures chimiques différentes de celles des protéines (**Attalah Kacem-chaouche, 1992**).




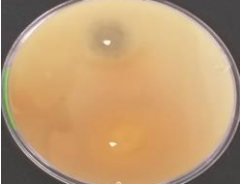
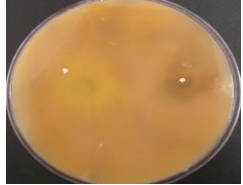
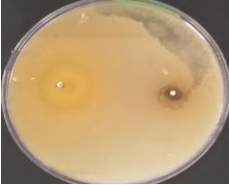
Cependant la culture où se trouve *Aspergillus sp* a été contaminé mais au-delà du 5<sup>ème</sup> jour, la moisissure a pris le dessus et a envahi la boîte de pétrie, une preuve de sa capacité à produire des métabolites anti bactériens avec un plus grand rendement que les autres. En effet, des tests réalisés par **Kholkhal (2005)** et **Devi et al. (2007)** sur des



cultures d'*Aspergillus* en présence d'isolats bactériens (bacilles Gram-) ont montré la sécrétion de substances antibactériennes présentant un large spectre d'action.

Ces résultats peuvent être d'un grand intérêt pour la recherche clinique si cette bactérie est pathogène pour l'homme ou l'animale.

**Tableau 11** : La résistance d'*Aspergillus sp* à la contamination bactérienne.

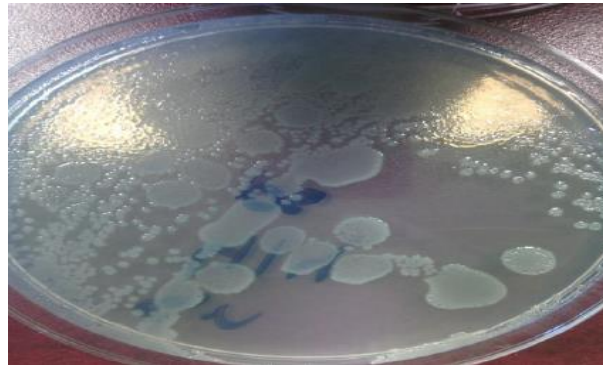
La souche	<i>Aspergillus Sp</i>		
<b>Surface</b>			
<b>Révère</b>			

## 6. Identification de la bactérie contaminante

Nous avons pensé à identifier la bactérie contaminante pour d'avantages de résultats originaux et complémentaires.

### 6.1. Identification macroscopique

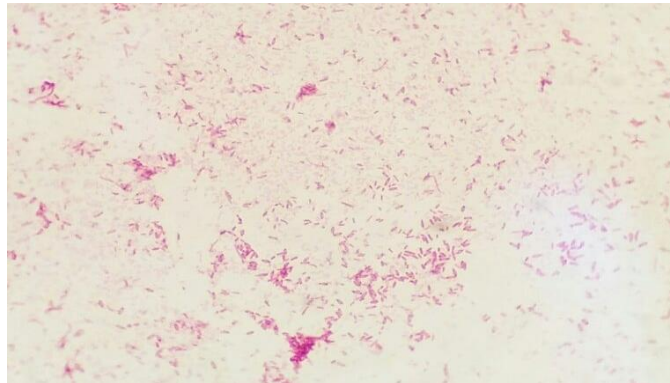
Un isolement et une purification ont été effectués à partir des boîtes de pétrie contaminée. Les colonies pures sont de grande taille et ont montrés un aspect bombé au centre et un contour irrégulier (colonies larges) (**figure 9**).



**Figure 9** : Aspect des colonies de la bactérie contaminante dans une boîte de Pétri.

## 6.2. Coloration de Gram

Après la coloration de Gram les souches purifiées sont apparues sous forme de bacilles roses. Elles possèdent des parois à Gram négatif. (**figure 10**).



**Figure 10** : Les bacilles Gram négatif de à objectif 100X.

## 6.3. Caractères biochimiques

### 6.3.1. Recherche d'oxydase

Absence d'une couleur bleu-violet sur le disque d'oxydase suggère que la bactérie ne possède pas l'enzyme cytochrome oxydase donc elle est oxydase - (**figure 11**).



**Figure 11** : Résultat négatif de l'oxydase chez la bactérie étudiée.

### 6.3.2. Recherche de catalase

Le dégagement de bulles de gaz signifie qu'il y a une production de la catalase et que le test est positif. (**figure 12**).



**Figure 12** : Résultat positif de catalase chez la bactérie étudiée.

### 6.3.3. Galerie Api 20 NE

➤ **Lecture de la galerie**

- Après incubation, la lecture de la galerie doit se faire sur la fiche de résultats (annexe 7).

➤ **Interprétation**

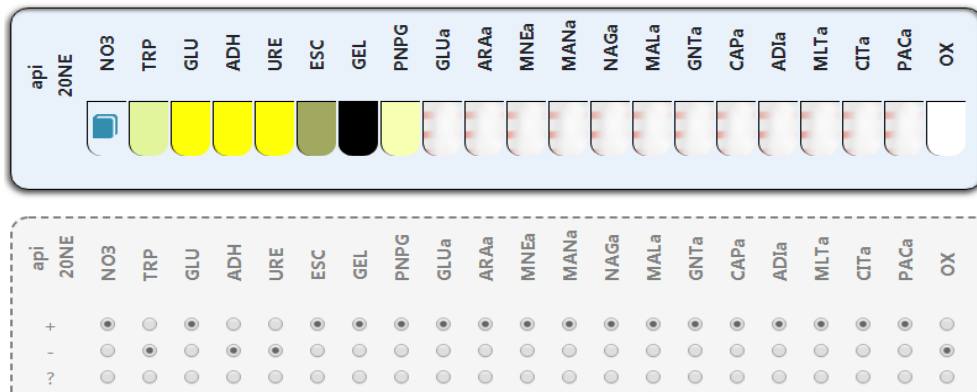
L'identification est obtenue à partir du profil numérique déterminé sur la fiche de résultats, les tests sont séparés par groupes de trois et une valeur 1, 2 ou 4 est indiquée pour chacun. En additionnant à l'intérieur de chaque groupe les valeurs correspondant à des réactions positives, on obtient 7 chiffres ; la réaction de l'oxydase qui constitue le 21<sup>o</sup> test est affectée de la valeur 4 lorsqu'elle est positive.

-Identification : Elle est réalisée à partir de LAB.UPBM.ORG se trouvant dans le lien <https://Lab.upbm.org/identifieur/galerie.php>.



**Figure 13 :** Résultat de galerie API 20 NE.

Nos résultats sont en accord avec la (figure 14) .



**Figure14 :** Résultat de galerie API 20 NE de LAB.UPBM.ORG.

<https://Lab.upbm.org/identifieur/galerie.php>.

D'après les résultats obtenus Il s'agit d'une bactérie appartenant à :

**Famille:** *Burkholderiaceae*

**Genre:** *Burkholderia*

**Espèce:** *Burkholderia cepacia*. (**Béatrice et al, 2014**).

Ancienne taxonomie : *Pseudomonas*

Ce genre regroupe un ensemble de bactéries qui colonisent une très large variété de niches écologiques (sol, eaux, rhizosphère, plantes ...), gram-négatif, mobile, aérobic, non fermentant, formant des bâtonnets. D'après **Béatrice et al. (2014)**, cette bactérie peut être responsable de la mélioïdose (maladie de Whitmore : image clinique variable allant d'une infection latente au développement de plusieurs abcès, pneumonie et bactériémie). *Burkholderia cepacia* peut provoquer des infections graves chez des patients atteints de fibrose kystique. Chez l'animal, elle donne lieu à la morve, une infection qui touche les chevaux et autres solipèdes (âne, mulet, ...).

D'autre part des résultats rapportés par **Mao et al. (1998)** ont montré la capacité de cette bactérie à réduire en plein champ, les maladies de la tomate provoquées par *Pythium ultimum*, *Rhizoctonia solani* et *Fusarium oxysporum*. En effet, *Burkholderia cepacia* peut être utilisée dans la lutte biologique et ce résultat explique justement comment cette bactérie a freiné la croissance des moisissures testés (**tableau 10**).

# *Conclusion*

## Conclusion

Le travail réalisé consiste à l'isolement et l'identification de souches fongiques capables de produire des enzymes à intérêt industriel. Ces microorganismes ont été isolés depuis un lac d'eau douce (Timerganine) située à Oum El Bouaghi, Algérie. En plus de leur capacité à produire les enzymes, ces moisissures ont été testés pour leurs activités antifongiques vis-à-vis d'un antagoniste (*Cladosporium cladosporioides*) et aussi testées les unes contre les autres pour leur effet antagoniste.

L'isolement et la purification sont réalisés sur milieu PDA et pour la mise en évidence de l'activité enzymatique, différents milieux gélosés sont utilisés avec addition d'un substrat inducteur pour chaque enzyme.

Les résultats de l'examen macroscopique et microscopique ont montré la présence de 18 souches de moisissures réparties en 9 genres dont *Aspergillus* est dominants par 33 % suivi de *Penicillium* avec 22 % suivie de *Fusarium* avec un pourcentage de 11 % et enfin *Rhizoctonia*, *Chaetomium*, *Verticillium*, *Ascochyta*, *Absidia*, *Alternaria* avec un pourcentage de 5 à 6 %.

Une mise en évidence de la production de quatre enzymes hydrolytiques extracellulaires (amylase, cellulase, pectinase et protéase) par les 18 souches isolées et identifiées est réalisée.

Les souches fongiques ont montré clairement la capacité de chaque souche isolée à produire au moins deux enzymes. Par ailleurs pour étudier le test d'antagonisme de nos souches. Le travail a été réalisé selon la confrontation direct. Le test de l'antagonisme entre les 9 isolats fongique choisi (*Rhizoctonia*, *Chaetomium*, *Verticillium*, *Aspergillus*, *Ascochyta*, *Absidia*, *Penicillium*, *Alternaria*, *Fusarium solani* et *Aspergillus niger*) contre *Cladosporium cladosporioides* a révélé que ce dernier à inhibée totalement la croissance des souches testées à l'exception d'*Aspergillus niger*. Par ailleurs, les résultats de la confrontation directe entre les différents isolats fongiques les unes contre les autres ont montré des pourcentages d'inhibition variant entre 17,74 à 90,78 %.

Certains tests d'antagonisme ont présenté une contamination bactérienne et l'identification de cette dernière a montrée qu'il s'agit de colonies rondes de grande taille avec un aspect bombée. L'observation microscopique montre une forme de bacilles à Gram négatif mobile. En effet les tests biochimiques ont permis d'obtenir le

profil numérique de cette bactérie et à partir d'une base de données spécifique, cette bactérie est identifiée comme étant *Burkholderia cepacia*.

Enfin ces résultats ouvrent d'autres perspectives qui consistent à la production d'enzymes par fermentation et déterminer les propriétés physico-chimiques et moléculaires de ces enzymes. Aussi identifier les métabolites secondaires capables d'effets antagonistes vis-à-vis d'autres souches dans une démarche environnementale dans la lutte biologique.

## *Références bibliographiques*



*A*

**Agger T., Sphor B., Carlesen M. et Nielsen J. (1998).** Growth and product formation of *Aspergillus oryzae* during submerged cultivations verification of morphologically structured model using fluorescent probes. *Biotechnol. Bioeng.* 57: 321-329

**Agrawal D., Patidar P., Banerjee T. et Patil S. (2005).** Alkaline protease production by a soil isolate of *Beauveria felina* under SSF condition: parameter optimization and application to soy protein hydrolysis. *Proc. Biochem.* 40: 1131–1136.

**Aidoo EF., Herdey R., et Wood BJB. (1981).** Estimation of fungal growth in a solid-state fermentation system. *European J. Appl. Microbiol. Biochem.* 33 : 6284-6294.

**Akbache N. et Bariout S. (2007).** Utilisation de planification expérimentale pour l'optimisation d'un milieu de culture à base de farine de dattes déclassées pour la production d' $\alpha$ -amylase de *Rhizopus oryzae*. Mémoire d'ingénieur : INATAA. Université Mentouri, Constantine, p 42.

**Alabouvette C., Olivain C., Migheli Q. et Steinberg C. (2009).** Microbiological control of soil-borne phytopathogenic fungi with special emphasis on wilt-inducing *Fusarium oxysporum*. *New Phytologist.* 184:529-544.

**Altieri M.A. (1999).** The ecological role of biodiversity in agro ecosystems. *Agri. Ecosystems Environ.* 74:19-31.

**Amaud A., Berset C., Bocquet J., Bouix M., Cerisie Y., Cuvelier EG-F.; De Nettancourt D., Engasser J-M., Goursaud J., Cnrenini M., Guiraud J-P., Richard H., Steenbrugge H., Teoule E., Thomas D. et Vandecasteele J-P. (1993).** *Biotechnologies.* ed., Scriban R. (éd), Technique et Documentation Lavoisier Paris, France, p 904.

**Attalah M et Kacem –Chaouche N. (1992).** Production of ochratoxin A in a semi synthetic: « in the second Regional Mycoligical Conf. *RMC 2* ». Cairo. Egypt.

*B*

**Baathe E., Soderström B-E. (1980).** Comparaisons of the agar-film and membrane filter methods for the estimation of the hyphal lengths in soil, with particular reference to the effect of magnification. *Soil Biol. Biochem.* 12, p 385-387.

- Barker T.W. et Worgan J-T. (1981).** The application off air. Lift frmenters to the cultivation of filementous fungi. EuropeenJ. App. Microbiol. Biotechnol, 13, p 77-83-148.
- Barnabé S., Sasseville J- L., Tyagi R- D. et Valéro J-R. (2003).** Eaux usées et résidus industriels, matières tertiaires ou matières premières ? VECTEUR environnement. 36 (2), 50-62.
- Barnett H.L., Hunter B.B. (1998).** Illustrated Genera of Imperfect Fungi, 4th ed. APS Press, St. Paul, MN.
- Béatrice J., Denis Pi., Els V. et Peter V. (2014).** Impact de l'utilisation d'un savon liquid contaminé par *Burkholderia cepacia* dans les hôpitaux en Belgique. Belgique: Dr. Johan Peeters. p 10-18.
- Bèguin P. et Aubert J P. (1994).** The biological degradation of cellulose, fems, microbiol. Rev. 13, P : 25-58.
- Benkahoul M., Belmessikh A., Boukhalfa H. et Mechakra-Maza A. (2017).** Optimisation à l'aide d'un plan d'expériences de la production d'une protéase fongique sur milieu à base de déchets agro-industriels. Journal Article, sciences et techniques issue N°75.
- Berraho E. (2009).** Cours de Microbiologie Générale. Laboratoire de Microbiologie et Biologie Moléculaire, B.P. 1014, Rabat (Page consulté le 15/05/2019). <https://doi.org/10.4267/dechets-sciences-techniques.3703>
- Biomérieux.** Api 20NE. [En ligne]. (Page consulter le 10/06/2019) <https://www.google.com/search?q=api20ne+biomerieux&oq=api20ne&aqs=chrome.2.69i57j0l5.9494j0j7&sourceid=chrome&ie=UTF-8>
- Boiron P. (1996).** Organisation et biologie des champignons. Nathan. Paris, p 19-79.
- Boland GJ. Et Hunter JE. (1988).** Influence of *Alternaria alternata* and *Cladosporium cladosporioides* on white mold of bean caused by sclerotium.candian journal of plant pathology 148, p 181-197.
- Bornscheuer T. (2002).** Microbial carboxylesterases. Classification, properties, and application in biocatalysis. FEMS Microbiology Reviews, p 73-81.

**Botton B., Beton A., Fever M., Gaithier S., Guy p-h., Larpent J-P., Reymond P. Sanglier J.J., Vayssie Y., Veau P. (1990).** Moisissures utiles et nuisibles importance industrielle. 2eme edition. Masson. Collection Biotechnologies, p 34-428.

**Botton B., Breton A., Fevre M., Gauthier S., Guy P., Larpent J-P., Reymond P., Sanglier J-J., Vayssier Y. et Veau P. (1999).** Moisissures utiles et nuisibles. Importance industrielle. Masson. Paris, p 12-426.

**Bourgeois C.M., Mesclé J.F. et Zucca J. (1989).** Microbiologie alimentaire. Aspect microbiologique de la sécurité et de la qualité des aliments. Lavoisier. Paris, p 216-244.

**Buhot D. (1973).** Echantillonnage de sols. Conservation et préparation des échantillons. Problème statistique. *Am. Phytopathol.* (N°5), 296-298.

### C

**Chabasse D., Bouchara J-P., De gentile L., Brun S., Cimmon B. et Penn P. (2002).** Cahier de formation les moisissures d'intérêt médicale.

**Chabasse D. (2002).** Les moisissures d'intérêt médical. Cahier N°25 de formation de biologie médicale, Bioforma.France. p 25-27.

**Chasseur C. et Norlad N. (2003).** Les champignons de l'habitat 1ère partie : introduction à la mycologie, risques pour la santé, EXPERISES. P 03-.04-07-08.

**Chesson A. (1987).** Supplementary enzymes to improve the utilization of pigs and poultry diets. *In:* Hresign W, Cole DJA, editors. Recent Advances in Animal Nutrition. London, Butterworths, p 71-89.

**Clark H., Geldriche E-F., Kabler P-W. et Huff C-B. (1985).** Identification of Industrial 65iquid65ganisms. *Appl. Microbiol. Process Biochem.* (N°30), 723-727.

**Clarke P-H. et Steel K.J. (1966).** Rapide and simple biochemical tests for bacterial identification. Academic press. London, p 111.

### D

**Davet P. (1996).** Optimisation de la production de la protéase neutre par *Aspergillus oryzae* sur milieu à base de déchets de tomates. Comparaison entre milieu solide et milieu 65iquid.

- David E.T., Reyna I.R., Emma Z.M., Patricia G.F., Judith G., Carolina P. (2017).** *Cladosporium cladosporioides* and *Cladosporium pseudocladosporioides* as potential new fungal antagonists of *Puccinia horiana* Henn., the causal agent of chrysanthemum white rust, (N°137),01.
- Debananda S., Pintubala K., Suchitra S. et Salam N. (2009).** Screening, identification of best producers and optimization of extracellular proteases from moderately halophilic alkali thermotolerant indigenous actinomycetes. *World. Appl. Sci. J.*, (N°7), 907-916.
- Delgado-Jarana J., Rincon A-M. et Benitez T. (2002).** Aspartyl protease from *Trichoderma harzianum* CECT 2413: cloning and characterization. *Microbiology.* (N°148), 1305-1315.
- Delarras C. (2014).** Pratique en microbiologie de laboratoire, Recherche de bactéries et de levures-moisissures. Edition Lavoisier. P 113 -114.
- Devi P- D., Souza L., Kamat T., Rodrigues C. et Naik GC. (2007).** Batch culture fermentation of *Penicillium Chrysogenum* and a report on the isolation, purification, identification and antibiotic activity of citrinin. *Indian Journal of Marine Sciences*, 38(1), 38-44
- Dhruba S. et Shukla A.K. (2008).** Starch Hydrolysis and  $\alpha$ -Amylase Activity of *Aspergillus* and *Chaetomium*. *Asian Journal of Biochemistry*, 3: 284-289.
- Dinu D., Nechifor M-T., Stoian G., Costache M. et DinischiotuA. (2007).** Enzymes with new biochemical properties in the pectinolytic complex produced by *Aspergillus niger* MIUG 16. *Journal of biotechnology*, 131(2), p 128-137.
- Domsch K-H., Gams W., et Anderson T.-H. (1980).** Compendium of Soil Fungi. Vol. 2. Academic Press, London, p 405.
- Drouin M. (2005).** Etude de production de protéases alcalines par *Bacillus licheniformis* en utilisant des boues d'épuration municipales comme substrat. Mémoire de Maîtres sciences (M.Sc.). Canada.
- Dvail, S., Greta J., et Lenzini M. (2010).** Les actinomycètes, source de biomolécules d'intérêt industriel. Haute école de la province de liège.

**E**

**Ertan F. et Balkan B. (2007).** Production of  $\alpha$ -Amylase from *Penicillium chrysogenum* under Solid-State Fermentation by Using Some Agricultural By-Products. *Food Technol. Biotechnol.* 45 (4), p 439-442.

**F**

**Fogarty W-M. et Kelly C-T. (1980).** Amylase, amyloglucosidase and related glucanases. In Rose (A.H.) Ed. *Economic microbiology, microbial enzymes and bioconversion*. London: Academic Press, Vol. 5, p 115-170.

**Frazier W-C. (1967).** *Food microbiology*. Academic presse. London. p 03-429.

**Fujita Y., Takashashi S., Ueda M., Tanaka A., Okada H., Morikawa Y., Kawaguchi T., Arai M., Fukuda H. et Kondo A. (2002).** Direct and efficient production of ethanol from cellulosic material with a yeast strain displaying cellulolytic enzymes. *Appl Environ Microbiol.* 68 (10): 5136-5141

**G**

**Gao J., Weng H., Zhou D., Yuan M., Guan F. et Xi Y. (2008).** Production and characterization of cellulolytic enzymes from the thermoacidophilic fungal *Aspergillus terreus* M11 under solid state cultivation of corn stover. *Bioresource Technol.* (N° 99), 7623-7629.

**García-Gómez M-J., Huerta-Ochoa S., Loera-Corral O. et Prado-Barragán L-A. (2009).** Advantages of a proteolytic extract by *Aspergillus oryzae* from fish flour over a commercial proteolytic preparation. *Food Chem.*, (N°112), 604–608.

**Germano S., Pandey A., Osaku C.A., Rocha S.N. et Soccol C.R. (2003).** Characterization and stability of proteases from *Penicillium* sp. produced by solid-state fermentation. *Enzyme Microb. Technol.*, 32: 246–251.

**Guiraud J-P. (1998).** *Microbiologie alimentaire*. Dunod. Paris. p 7-330.

**Gupta R., Gigras P., Mohapatra H., Goswami K-V. et Chauhan B. (2003).** Microbial  $\alpha$  - amylase: a biotechnological perspective. *Process Biochem* (N°38), 1599-1616.

*H*

**Hajji M., Kanoun S., Nasri M. et Gharsallah N. (2007).** Purification and characterization of an alkaline serine-protease produced by a new isolated *Aspergillus clavatus* ES1. Proc. Biochem., 42: 791–797.

**Harrigan W.F. et Mccance M.E. (1976).** Laboratory methods in food and dairy microbiology. Academic press. London. p 21-277.

**Hibar K., Daami-Remadi M., Khiareddine H. et El Mahjoub M., (2005) –** Effet inhibiteur *in vitro* et *in vivo* du *Trichoderma harzianum* sur *Fusarium oxysporum*; *fusarium. sp. radicis-lycopersici*; Biotechnol. Agron. Soc. Environ. 9 (3), 163–171.

**Hoch HC. (1977).** Mycoparasitic relationships: *Gonatobotrys simplex* parasitic on *Alternaria tenuis*. *Phytopathology*, 67: 309–314.

**Houhamdi M., Maazi M-C., Seddik S., Bouaguel L., Bougoudjil S. et Saheb M. (2009).** Statut et écologie de l'Erismature à tête blanche *Oxyura leucocephala* dans les hauts Plateaux de l'Est de l'Algérie. *Aves*, 1 : 129-148.

*J*

**Jayani R-S., Saxena S. et Gupta R. (2005).** Microbial pectinolytic enzymes: À review. Process Biochemistry. (N° 40), 2931–2944.

**Joffin JN. et Leyral G. (2006).** Microbiologie Technique Tome 1 " Dictionnaire des techniques". CRDP AQUITAINE. Bordeaux. p 189-250.

**Jouani J-P. et yiannicouris A. (2002).** Les mycotoxines dans les aliments des ruminants, leur devenir, leurs effets chez l'animal. INRA ; Production animale 15 (1), p 3-16.

**Julien R. (2002).** Les moisissures parlons-en. Objectif prévention. 25 (4), p 07-08.

*K*

**Kader A-J., Omar O. et Feng L-S. (1999).** Isolation of cellulolytic fungi from the barrio Highlands, Sarawak. University of Kebangsaan, Malaysia. Review of Biodiversity and Environmental Conservation.

**Karam H. et Karam N-E. (2000).** Isolement et identification de bactéries lactiques du lait cru de chamelle. XIIème Journées Nationales de Microbiologie. Constantine.

**Kathiresan K. et Manivannan S. (2006).**  $\alpha$ -amylase production by *Penicillium fellutanum* isolated from mangrove rhizosphere soil. African Journal of Biotechnology Vol. 5 (10), p 829-832.

**Kholkhal W. (2005).** Recherche de nouvelles souches fongiques productrices d'antibiotiques à partir du sol et des concrétions sédimentaires des grottes de Aïn Fezza. Mémoire de Magister, Université Abou BekrBelkaid, Tlemcen, p 85.

**Kitamoto N., Go M., Shibayama T., Kito Y., Ohmiya K. et Tsukagoshi N. (1996).** Molecular cloning, purification and characterization of two endo-1, 4- $\beta$ -glucanases from *Aspergillus oryzae* KBN 616. Appl Microbiol Biotechnol. 46: 538-544.

**Korish M. (2003).** Production, purification, properties and application of the cellulose From a wild type strain of a yeast isolate. Faculty of biology, Johannes gutenberg-University, mainz, germany.

**Kosikowski F-V. (1988).** Dairy foods research papers. Enzyme behavior utilization in dairy technology. J. Dairy Sci. (N° 71), 557-573.

**Kubicek C P., Bissett J., Druzhinina I., Kullnig-Gradinger C. et Szakacs G. (2003).** Genetic and metabolic diversity of *Trichoderma sp.*: a case study on South-East Asian isolates. Fungal Genet Biology. 38 (3): 310-319.

**Kumer G. et Nagesh N. (2008).** purification of extracellular acid protease and analysis of fermentation methabolites by *synergistes sp.* utilizing proteinaceous solid wast from tanneries. bioresourcetechnologie. (N °99), 2364-2372.

£

**Larpent J-P. et Larpent G. M. (1990).** Mémento technique de microbiologie. Tec & Doc, Lavoisier, Paris. p 471.

**Larpent-Gourgaud M. et Sanglier J. (1992).** Biotechnologies. Principes et **Laxman R.S., Sonawane A.P., More S.V., Rao B.S., Rele M.V., Jogdand V.V.,**

**Deshpande V.V., Rao M.B. (2005).** Optimization and scale up of production of alkaline protease from *Conidiobolus coronatus*. Proc. Biochem., 40; 3152–315 méthodes. Doin. Paris. p 574-587.

**Leisola M., Jokela J., Pastinen O., Turunen O. (2001).** Industrial use of enzymes. Laboratory Bioproc. Eng., Helsinki University of Technology, Finland, nd Hans Schoemker, DMS Reserch, MD Geleen, The Netherlnds.

**Leveau J-Y. et Bouix M. (1993).** Les moisissures. In : Florent J. (ed), Microbiologie industrielle. Les microorganismes d'intérêt industriel. Edition Tec et Doc-Lavoisier Apria, p 112-163.

**Lokington R A. et Kelly J M. (1997).** Direct conversion of cellulose to ethanol by engineered filamentous fungi. *Environmental Biotechnology*. 7 (6): 363-368.

**Lonsane B.K. et Ramesh M. V. (1990).** Production of bacterial thermo stable  $\alpha$ -amylase by solid state fermentation: a potential tool for achieving economy in enzyme production and starch hydrolysis. In: *Advances in applied microbiology*, vol. 35. San Diego: California Academic Press, p 1-56.

**Lucio de Souza E., Erika M. E. H., Castilho V. M., Delima A., Bellini M. Z., Cruz D. et Cruz Z. R. (1996).** Purification and characterization of  $\alpha$ -amylase from *Rhizopus* sp. *Arq.Biol.Technol.* 39 (4), 831-839.

*M*

**Maazi M.C. (2009).** Eco éthologie des anatidés hivernant au niveau de Garaet Timerganine Wilaya d'Oum el bouaghi, Thèse de doctorat, Université Badji Mokhtar Annaba. p 106.

**Mao W., Lewis A., Lumsden R.D. et Hebbar K.P., 1998.** Biocontrol of selected soilborne diseases of tomato and pepper plants. *Crop Prot.* 17, p 535-542.

**Mehravar M. et Sardari S. (2011).** Screening of antimicrobial membrane-active metabolites of soil microfungi by using chromatic phospholipid/polydiacetylene vesicles. *Journal of Medical Mycology*, 21 (3): 188-197.

**Meziani D-j. et Mahcen Z. (2017).** Activités hydrolases des souches fongiques. Production par fermentation de cellulase et d' $\alpha$ -amylase par *Penicillium. sp* sur substrat solide. Mémoire. : Université Mentouri. Constantine, p 55.

**Miller J-D. (2002).** Enzymic hydrolysis of protein by various enzyme preparations. *J. Ferment. Technol.*(N°54), 872-884.

**Mokrani M. (2011).** Contribution à la conservation du flamant rose phoenicopterus roseus Caractérisation des milieux utilisés et évaluation de l'impact anthropique sur le complexe de zone humide des hauts plateaux du nord –est Algérien. thèse de de magister. Université Batna. p 18-20.



**Morin O. (1994).** *Aspergillus* et aspergilloses : biologie, Ed. Techniques Encyl. Med. Chir. (Elsevier, Paris), Maladies infectieuses 8-600-A-10.

**Moussaoui M. (2010).** Développement et extraction des métabolites secondaire de *Trichoderma viride* et leurs effets biologiquement actifs. Mémoire de master. Université Mentouri. Constantine, p 35

**N**

**Nautiyal C.S., (2000).** Biocontrol of plant diseases for agricultural sustainability. In: Biocontrol potential and its exploration in sustainable agriculture. Upadhyay R.K., Mukherji K.G., Chamola B.P. (Eds). Kluwer Academic/Plenum Publishers, USA.p 9-23.

**Neiss S. et Montenecourt B C. (1984).** Characterization of the secreted cellulases of *Trichoderma reesei* wild type and mutants during controlled fermentations. ApplMicrobiol Biotech. 20 : 46-53.

**Nicklin J., raeme-Cook K., Paget T. et Killington R. (2000).** L'essentielen microbiologie. Edition Berti. p 210-216.

**Nogawa M., Goto M., Okada H. et Morikawa Y. (2001).** L-Sorbose induces cellulase gene transcription in the cellulolytic fungus *Trichoderma reesei*. Curr Genet. 38: 329-334.

**O**

**Oikawa T. (1998).** Endo-glucanase secreted by a Psychrotrophic yeast: purification and Characterization.

**Oteng-Gyang K. (1984).** Introduction à la microbiologie alimentaire dans les pays chaud. Lavoisier. Paris. p 26-42.

**Ouldjaoui A. (2010).** Contribution à l'étude de l'écologie du Flamant rose *Phoenicopterus roseus* dans les zones humides des hautes plaines de l'Est Algérien.thèse de doctorat. Universite Badji Mokhtar, Annaba p 43.

**P**

**Parenicova L., Benen J-A., Kester H-C. et VISSER-J. (2000).** expressed endopoly galacturonases from *Aspergillus niger*. *Biochemistry Journal*. (N°345), 637-644.

**Patel R., Dodia M. et Singh S-P. (2005).** Extracellular alkaline protease from a newly isolated haloalkaliphilic *Bacillus sp*: Production and optimization. *Biochemistry Journal*. (N°40), 3569-3575.

**Pelmont J. (1995).** Enzymes : Catalyseurs du monde vivant. Presse Universitaire de Grenoble. (7), (N°621), 652-654.

**Pereira E., Santos A., Reis F., Tavares R.M., Baptista P., Lino-Neto T. et Almeida-Aguiar C. (2013).** A new effective assay to detect antimicrobial activity of filamentous fungi. *Microbiological Research*, 168 (1): 1-5.

**Petterson G., Farger S L., Bhikhabhai R. et Leandroer K. (1981).** In the Ekman-Days. International Symposium on wood and pulping Chemistry, SCPI, Stockholm, 111.p 39.

**Punt P-J., VanBiezen N., Conesa A., Albers A., Mangnus J. et Vanden Hondel C. (2002).** Filamentous fungi as cell factories for heterologous protein production. *Trends Biotechnol.* 20 (N°5), 200-206.

℞

**Rai S-K. et Mukherjee A-K. (2010).** Statistical optimization of production, purification and industrial application of a laundry detergent and organic solvent-stable subtilisin-like serine protease (Alzziprase) from *Bacillus subtilis* DM-04. *Biochem.Eng.j.* (N°48), 173–180.

**Ray R. R. (2001).** Production of  $\alpha$ -amylase and xylanase by an alkalophilic strain of *Penicillium griseoroseum* RR-99 *Acta Microbio.* vol, 50(3-4): 305-309.

**Regnault J. P (1990).** Microbiologie industrielle et génie biochimique, (éd) Masson et Cie. p 23-85

**Richard K-F. (2005).** Génomique fonctionnelle in vivo de loxydoréductase PA3498 chez *Pseudomonas aeruginosa*. Université Laval, Québec

**Rinaldi C., Sutton A. et Fothergill S-R. (1998).** The morphology of fungi. *Appl. Environ.Microbial.* (N°67), 123-129.

**Riou C., Salmon J M., Vallier M J., Gunata Z., Barre P. (1998).** Purification, characterization, and substrate specificity of a novel high glucose tolerant  $\beta$ -glucosidases from *Aspergillus oryzae*. *Appl Microbiol Biotrechnol.* 64 : 3607-3614.

**Rivière J. (1975).** Les applications industrielles de la microbiologie : Collection sciences agronomiques. Masson et Cie (éd.). p31-195.

**Ronald K-S. et Harold S-L. (1970).** Methods for the isolation of proteolytic marine bacteria. *Appl. Microbiol.* In: Shivanand P., Jayaraman G. (2009). Production of extracellular protease from halotolerant bacterium *Bacillus aquimaris* VTTP4 isolated from kumta coast. *Process Biochem.* (N°44), 1088-1094.

S

**Saheb M. (2009).** Ecologie de la reproduction de l'Avocette élégante *Recurvirostra avosetta* et de l'Echasse blanche *Himantopus himantopus* les hautes plaines de l'Est-algérien. Thèse de doctorat, université Badji Mokhtar, Annaba. p 250.

**Sathya R., Pradeep B.V., Angayarkanni J., Palaniswamy M. (2009).** Production of milk clotting protease by a local isolate of *Mucor circinelloides* under SSF using agroindustrial wastes. *Biotechnol. Bioproc. Eng.*, 14; 765-794.

**Saxena S., Shukla S., Thakur A., et Gupta R. (2008).** Immobilization of polygalacturonase from *Aspergillus niger* onto activated polyethylene and its application in apple juice clarification. *Microbiologica et Immunologica Hungarica*, 55(1), p 33-51.

**Seddik. S., Mazzi. M-C., Hafid. H., Saheb. M., Mayache. B., Metallaoui. S., et Houhamdi. M. (2010).** Statut et écologie des peuplements de Laro-limicoles et d'Echassiers dans le Lac de Timerganine (Oum El-Bouaghi, Algérie), *Bulletin de l'Institut Scientifique, Rabat, section Sciences de la Vie*, 2010, n°32 (2), 111-118.

**Seidl V., Marchetti M., Schandl R., Allmaier G., et C.P. Kubicek. (2006).** Ep11, the major secreted protein of *Hypocrea atroviridis* on glucose, is a member of a strongly conserved protein family comprising plant defense response elicitors. *FEBS J.* 273 :4346-4359.

**Scriban R. (1999).** *Biotechnologie. 5eme édition. Technique et Documentation.* Lavoisier. Paris, p 149-159.

**Sheikh I. et Sapkota D. (2010).** Effect of feeding silk worm pupae meal on nutrient an  
**Singleton P. (2005).** *Bactériologie pour la médecine, la biologie et les biotechnologies,* (6th edn) DUNOD. Paris.

**Sivan A. et Chet, I. (1989).** Degradation of Fungal Cell Walls by Lytic Enzymes. d mineral retention in broilers. *Indian Vet. J.*, 87 (10): 1049-105.

**Smith n.R., Gordon R.E. et Clark F.E. (1952).** Aerobic spores-forming bacteria. J. Appl. Bact. (N°27),78-99.

**Smith J.E. et Pateman J.A. (1977).** Genetics and Physiology of *Aspergillus*. Academic press. London.

T

**Tankeshwar A. (2013).** Catalase test: principle, uses, procedure and results. BiochemicaTests for Gram Negative Bacteria. <http://www.microbeonline.com>.

**Tarr S. (2004).** Yeasts from Lesotho - Their classification and possible applications. Thèse de doctorat. Faculty of Natural and Agricultural Sciences. University of the Free State. South Africa.

**Tatsinkou F-B., Taveai F. et Ndjouenkeui R. (2005).** Production and partial characterization of a thermostable amylase from ascomycetes yeast strain isolated from starchy soils. *African Journal of biotechnology*, 4(1), p 14-18.

U

**Uchikoba T., Mase T., Arima K., Yonezawa H. et Kaneda M. (2001).** Isolation and characterization of a trypsin-like protease from *Trichoderma viride*. *Biol. Chem.* (N° 382), 1509-1513.

**Ui-haq I., Mukhtar H., Daudi S., Sikander A., et Quadeer M. A. (2003).** Production of proteases by a locally isolated mould culture under lab condition. *Biotechnology* 2 (1), p 30-36.

**Ulacio D., Perez C., Pineda Y-J. (1997).** Mycoflora in tobacco plant roots (*Nicotiana tabacum*) in Portuguesa state, Venezuela. *Bioagro*. 9 (1), p 3-11.

V

**Van den Burg B. (2003).** Extremophiles as a source for novel enzymes. *Current Opinion in microbiology*. (N° 6), 213-218.

**Vannacci G. et Harman GE. 1987.** Biocontrol of seed-borne *Alternaria raphani* and *A. brassicicola*. *Canadian Journal of Microbiology* 33: 850–856.

**Vincent M. (1996).** Blood glucose: Its measurement and clinical importance. *Clinica*

Chimica.

X

**Xu B. (2002).** Endoglucanase and Mannanase from Blue Mussel, *Mytilus edulis*: Purification, Characterization, Gene and Three-Dimensional Structure. Thèse de doctorat. Faculty of Science and Technology, Uppsala University, Sweden.

Z

**Zhang Q., Zhang J., Yang L., Zhang L., Jiang D., Chen W. et Li G. (2014)** Diversity and biocontrol potential of endophytic fungi in Brassica napus. Biological control 72: p 98-108.

# *Résumé*

## Résumé

Dans le cadre de la recherche d'enzymes d'intérêt industriel, des isolats fongiques isolés depuis un lac d'eau douce se trouvant à Garaet Timerganine, Oum El Bouaghi, Algérie ont été testés. Dix-huit souches de moisissure sont purifiées et identifiées puis testées pour leur activité enzymatique et finalement des tests d'antagonisme entre les isolats et contre une souche entomopathogène (*cladosporium cladosporioides*).

L'étude macroscopique et microscopique des souches fongiques a montré que les dix-huit souches de moisissures représentent 9 genres (*Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Rhisoctonia*, *Chaetomium*, *Verticilium*, *Ascochyta*, *Absidia* et *Alternaria*). Les genres les plus dominants sont *Aspergillus* et *Penicillium*.

Les activités enzymatiques recherchées (amylolytiques, cellulolytiques, pectinolytiques et protéolytiques) chez les souches fongiques isolées sont testées sur un milieu spécifique pour chaque activité enzymatique. La totalité des souches fongiques présentent au moins deux activités enzymatiques.

Les résultats de la confrontation des différents isolats ont permis d'obtenir une inhibition totale de l'antagoniste *cladosporium cladosporioides vis-à-vis* les isolats fongiques testées. À l'exception d'*Aspergillus niger* qui présenté a un effet inhibiteur sur *cladosporium cladosporioides* par ailleurs la confrontation entre nos souches montrent un pourcentage d'inhibition variant de 17.74 à 90.78%.

Une contamination bactérienne dans quelques boites a été signalé et l'identification du contaminant montre que cette bactérie est *Burkholderia cepacia*.

**Mots clés :** lac d'eau douce, moisissures, amylase, cellulase, pectinase, protéase, antagonisme.

## Abstract

As part of the search for enzymes of industrial interest produced by fungal isolates isolated from a freshwater lake in Garaet Timerganine, Oum El Bouaghi, Algeria. Eighteen mold strains were purified and identified and tested for their catalytic activity and finally antagonistic tests between the isolates and against an entomopathogenic strains (it is *Cladosporium cladosporioides*).

The macroscopic and microscopic study of the fungal strains showed that the eighteen strains of isolated, tested and selected molds represent 9 genera (*Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Chaetomium*, *Verticillium*, *Ascochyta*, *Absidia* and *Alternaria*). The most dominant genera are *Aspergillus* and *Penicillium*.

The desired enzymatic activities (amylolytic, cellulolytic, pectinolytic and proteolytic) in isolated fungal strains are tested on a specific medium for each enzymatic activity.

All the fungal strains and have at least two enzymatic activity.

The results on the contacting of the different isolates obtained by the direct confrontation method, made it possible to obtain a total inhibition of the antagonist *Cladosporium cladosporioides* vis-à-vis the fungal isolates tested. With the exception of *Aspergillus niger* and the only strain that has an inhibitory effect on *Cladosporium cladosporioides* otherwise the confrontation between our strains show a percentage inhibition range from 17.74 to 90.78 %. What a significant, medium and in some cases very significant effect like *Aspergillus niger*.

Bacterial contamination in a few cases has been reported and identification of the contaminant shows that this bacterium is *Burkholderia cepacia*.

**Key words:** freshwater lake, mold, amylase, cellulase, pectinase, protease, antagonism.



## ملخص

كجزء من البحث عن الإنزيمات ذات الاهتمام الصناعي التي تنتجها السلالات الفطرية المعزولة من بحيرة المياه العذبة في غرة تيميرجانين، أم البواقي، الجزائر. تم تنقية ثماني عشرة سلالة وتحديدتها واختبارها لنشاطها الأنزيمي بالإضافة الى اختبارات المواجهة بين العزلات وضد سلالة تصيب الحشرات (وهي *Cladosporium cladosporioides*).

أظهرت الدراسة المجهريه للسلالات الفطرية أن السلالات الثمانية عشر المعزولة والمختبرة والمختارة تمثل 9 أنواع ( *Alternarie, Absidia, Verticillium, Chaetomium, Rhizoctonia, Penicillium, Aspergillus* )

تم اختبار الأنشطة الإنزيمية المطلوبة (النشاء، كربوكسي مثيل سلولوز، البكتين وتحليل البروتين) في سلالات الفطرية المعزولة على وسط محدد لكل نشاط انزيمي. حيث جميع السلالات الفطرية لها نشاط إنزيمي واحد على الأقل.

أتاحت نتائج اختبار العزلات الفطرية المختلفة بطريقة المواجهة المباشرة، الحصول على تثبيط كلي ضد (*Cladosporium cladosporioides*). بخلاف *Aspergillus niger* السلالة الوحيدة التي لها تأثير تثبيطي على السلالة *Cladosporium cladosporioides*.

من جهة أخرى، تظهر المواجهة بين سلالاتنا أن نسبة التثبيط تتراوح من 17.74 إلى 90.78 بالمئة. نتائج اختبار المواجهة المباشرة تعرضت لتلوث بكتيري في عدد قليل من علب البيتري، ومن خلال الدراسة الظاهرية و المجهريه، والكيمياء الحيوية لهذه البكتريا أظهرت أنها *Burkholderia cepacia*.

**الكلمات المفتاحية:** بحيرة المياه العذبة، الأميلاز، السليلاز، البكتيناز، البروتياز، تضاد.

# *Annexes*

**Annexe 01 : Solutions**

➤ **Eau physiologique**

Chlorure de sodium.....	9 g
Eau distillée.....	1000 ml

➤ **Solution de chlorure de sodium (NaCl) 1M**

Chlorure de sodium.....	58.44 g
Eau distillée.....	1000 ml

**Annexe 02 : Milieux pour l'isolement et la purification**

➤ **Milieu Poato Dextrose Agar (PDA)**

Pomme de terre .....	200 g
Glucose .....	20 g
Agar .....	20 g
Eau distillée.....	1000 ml

Laver la pomme de terre et la couper en petit cubes

- Mettre dans 500 ml d'eau distillée et porter à l'ébullition pendant 1 heure.
- Écraser et filtrer la pomme de terre afin d'obtenir l'extrait.
- D'autre part, faire fondre l'agar dans un petit volume d'eau distillée.
- Ajouter le filtrat à la solution d'agar.
- Ajouter le glucose.
- Ajuster le volume à 1000 ml.
- Agiter le milieu jusqu'à homogénéisation.
- Stériliser par autoclavage à 121 °C pendant 20 min.

➤ **Gélose nutritive (GN)**

Extrait de viande .....	10 g
Extrait de levure .....	2 g
Peptone .....	5 g
Chlorure de sodium .....	5 g
Agar.....	15 g
Eau distillée .....	1000 ml

pH= 7,4

**Annexe 03 : Lactophénol-bleu coton**

Phénol en cristaux .....	20 g
Acide lactique (25 %) .....	20 ml
Glycérol.....	20 ml
Eau distillée.....	4 ml

Bleu de méthylène.....0.5 g

#### Annexe 04 : Milieux pour les tests enzymatiques

##### ➤ Milieu PDA à 1 % d'amidon

Extrait de pomme de terre .....1000 ml  
Amidon .....10 g  
Glucose .....20 g  
Agar .....20 g

- 200 g de pomme de terre non pelées vieilles sont lavés et coupés en petites dés ensuite mis dans un litre d'eau distillée et portés à ébullition pendant 1heure, ils sont enfin écrasés, filtré, compléter à 1 L d'eau distillée.

- L'agar et l'amidon sont dissous à chaud dans l'extrait de pomme de terre. Compléter à un litre d'eau distillée, ajuster le pH à 5 et stériliser à 110 °C, pendant 30 min.

##### ➤ Milieu (CMC-agar)

CMC .....20 g  
Extrait de levure .....5 g  
Agar .....15 g  
Eau distillé.....1000 ml  
pH=5

##### ➤ Milieu pectine

Pectine.....5 g  
Extrait de levure.....5 g  
Agar.....20 g  
Eau distillée.....1000 ml

##### ➤ Milieu lait gélosé à 20 % d'agar

Lait écrémé .....100 g  
Agar.....20 g  
Eau distillée.....1000 ml

**Annexe 05 : Les indicateurs colorés**

➤ **Rouge Congo à 0.1 %**

Rouge Congo .....	0.1 g
Eau distillé .....	100 ml

- Dissoudre 0.1 g de Rouge Congo dans un petite volume d'eau distillée puis compléter le volume jusqu'à 100 ml.

➤ **Eau iodée (Lugol)**

Iode .....	1 g
Iodure de potassium .....	2 g
Eau distillé .....	100 ml

- Dissoudre 2 g d'iodure de potassium dans un peu d'eau distillée puis ajouter 1g d'iode, ensuite compléter à 100 ml d'eau distillée (ajouter éventuellement un peu d'iode pour permettre la dissolution totale de l'iode).

➤ **Acétate de cuivre à 7.5 %**

Acétate de cuivre.....	7.5 g
Eau distillée.....	100 ml

- Dissoudre 7,5 g de l'acétate de cuivre dans un petite volume d'eau distillée puis compléter le volume jusqu'à 100 ml.
- Dissoudre l'agar dans de l'eau distillée chaude
- Agiter jusqu'à homogénéisation pour obtenir l'eau gélosée
- Stériliser par autoclavage à 121 ° C pendant 20 min.
- Ajouter le lait écrémé stérile juste avant l'utilisation du milieu

**Annexe 06 : Réactifs de la coloration de Gram**

➤ **Violet de gentiane**

Violet de gentiane.....	1 g
Alcool éthylique à 95 % .....	10 ml
Phénol.....	2 g
Eau distillée.....	100 ml



➤ **Lugol de Gram**

Iodure de potassium.....	1 g
Iode .....	1 g
Eau distillée.....	300 ml

➤ **Fuschine de ziehl (Guiraud et Galzy, 1980)**

Fuschine.....1 g  
 Alcool éthylique à 95 %.....10 ml  
 Phénol ajoutés à 100 ml d'eau distillée.....5 g

**Annexe 07 : Galerie Api 20 NE**

		CE 07224 B		REF.: _____																	
		Origine / Source / Herkunft / Origen / Origen / Προέλευση / Ursprung / Oprindelse / Pochodzenie :																			
																					
24 h	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-		
48 h	NO <sub>2</sub>	TRP	GLU	ADH	URE	ESC	GEL	PNG	GLUJ	LARA	IMNE	IMAN	INAG	IMAL	IGNI	ICAP	LAQJ	IMLT	LCIT	IPAC	OX
24 h	5			4			7			7			7			7				3	
48 h																					
Autres tests / Other tests / Andere Tests / Otras pruebas / Altri test / Outros testes / Άλλες εξετάσεις / Andra tester / Andre tests / Inne testy :											Ident. / Ταυτοποίηση :										

## Activités hydrolytiques et antagonistes des moisissures isolées depuis le lac d'eau douce « Timerganine »

Mémoire de fin de cycle pour l'obtention du diplôme de Master en Écologie Microbienne

Dans le cadre de la recherche d'enzymes d'intérêt industriel, des isolats fongiques isolés depuis un lac d'eau douce se trouvant à Garaet Timerganine, Oum El Bouaghi, Algérie ont été testés. Dix-huit souches de moisissure sont purifiées et identifiées puis testées pour leur activité enzymatique et finalement des tests d'antagonisme entre les isolats et contre une souche entomopathogène (*Cladosporium cladosporioides*).

L'étude macroscopique et microscopique des souches fongiques a montré que les dix-huit souches de moisissures représentent 9 genres (*Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Chaetomium*, *Verticillium*, *Ascochyta*, *Absidia* et *Alternaria*). Les genres les plus dominants sont *Aspergillus* et *Penicillium*.

Les activités enzymatiques recherchées (amylolytiques, cellulolytiques, pectinolytiques et protéolytiques) chez les souches fongiques isolées sont testées sur un milieu spécifique pour chaque activité enzymatique. La totalité des souches fongiques présentent au moins deux activités enzymatiques.

Les résultats de la confrontation des différents isolats ont permis d'obtenir une inhibition totale de l'antagoniste *Cladosporium cladosporioides vis-à-vis* les isolats fongiques testées. À l'exception d'*Aspergillus niger* qui présenté à un effet inhibiteur sur *Cladosporium cladosporioides* par ailleurs la confrontation entre nos souches montrent un pourcentage d'inhibition variant de 17,74 à 90,78 %.

Une contamination bactérienne dans quelques boites a été signalée et l'identification du contaminant montre que cette bactérie est *Burkholderia cepacia*.

**Mots clés :** lac d'eau douce, moisissures, amylase, cellulase, pectinase, protéase, antagonisme.

**Laboratoire de recherche :** Laboratoire de Zoologie. Faculté S.N.V. U. C.1 ; E.H.S. C.

Jury d'évaluation :

**Président du jury :** Dr. Abdelaziz Wided (M.C.B. UFM Constantine1).

**Rapporteur :** Dr. BENKAHOUL Malika (M.C.B. UFM Constantine1).

**Examineurs :** Dr. LEGHLIMI Hind (M.C.A. UFM Constantine1).

**Date de soutenance :** 07/07/2019