



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 1
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة 1
كلية علوم الطبيعة و الحياة

Département : Microbiologie

قسم : الميكروبيولوجيا.

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

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Biotechnologies

Spécialité : Mycologie et Biotechnologie Fongique

Intitulé :

**Etude de quelques activités métaboliques des souches
fongiques isolées à partir de *Sebkha d'EL MGHIER* de
la région de *Biskra Algérienne*.**

Présenté et soutenu par :

CHEURFI Amira

BENHANNACHI Radja

Le : 14/07/2019

Jury d'évaluation :

Présidente du jury : Melle. ABDELAZIZ W.
Promotrice : Melle. BELMESSIKH A.
Examinatrice : Melle. MEZIANI M.

M. C. - UFM Constantine 1.
M. A. - UFM Constantine 1.
M. A. - UFM Constantine 1.

***Année universitaire
2018 - 2019***

Remerciements

Tout d'abord, nous remercions ALLAH, le tout puissant qui nous avoir accordé la santé, la volonté et la patience pour bien achever ce modeste travail.

En premier lieu, nos remerciements les plus sincères s'adressent à notre honorable encadreur Melle BELMESSIJKH Aicha, Maître Assistante à la faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université des Frères Mentouri Constantine 1, pour avoir accepté de diriger ce mémoire. Sa rigueur scientifique, sa disponibilité, ses précieuses directives, son soutien et sa patience tout au long de la réalisation de ce travail, ont été pour nous une aide inestimable. Qu'elle trouve dans ce travail le témoignage de notre sincère gratitude et profond respect.

Nous tenons à remercier vivement, Melle ABDELAZIZ Ouided, Maître de conférences à la faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université des Frères Mentouri Constantine 1, pour avoir accepté de présider le jury de ce mémoire.

Nos remerciements s'adressent également à Melle MEZJANI Meriem, Maître Assistante à la faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université des Frères Mentouri Constantine 1, qui a accepté d'examiner notre travail avec bienveillance.

Nôtre sincère reconnaissance à nos enseignants du Département de Microbiologie

Nous remercions aussi l'ensemble du personnel de laboratoires de Microbiologie au (RDC), de, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université des Frères Mentouri Constantine 1. Nous sommes très reconnaissants pour l'aide et l'appui technique durant toute la période de réalisation de ce travail.

Enfin, nous remercions tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à l'élaboration de ce modeste travail, trouvent ici l'expression de notre profonde gratitude et respect.

Dédicace

*Je remercie, tout d'abord, Dieu tout
puissant, pour avoir guidé mes pas
vers un avenir inchaallah prometteur, où le travail, la
persévérance et la quête du savoir seront ma devise*

Je dédie ce travail à :

*Ma chère mère qui s'est tant battue pour mon bien être, Sans
lequel je ne serai jamais arrivée là où j'en suis.*

*À mes Frères : Hamza, Fateh, Walide, gassal, khalesd et
aymene*

À mon fiancé khafis qui m'a toujours soutenu

À mon binôme Radja et toute sa famille

À mes amis, mes proches et toute ma famille

Amira.

Dédicace

Au nom de Dieu Tout Puissant

Je dédie ce travail A ma chère mère, à mon cher père, les deux personnes qui se sont beaucoup sacrifiées pour moi, m'ont aidée et soutenue, sans eux je n'aurais eu la volonté d'atteindre ce niveau.

Mon mari Youcef qui m'a toujours soutenu.

Je dédie se travaille surtout à mon petit pomme d'amour MOHAMMED RACIM que dieu me protège.

A mes chers frères Roumaissa, Djalila et Aissa qui ont toujours été là pour moi

A toute ma famille A toutes mes copines, camarades, cousines, cousins et collègues

A mon binôme Amira et toute sa famille

A tous les enseignants et les éducateurs qui ont contribué à ma formation durant tout le parcours de mes études jusqu'à ce jour ; A toute la promotion de 2018/2019 Mycologie et biotechnologie fongique.

RADJA.

Table des matières

	page
Liste des abréviations	
Liste des tableaux.....	
Liste des figures	
INTRODUCTION	1
PARTIE 01 : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	
1. Le Sol	3
1.1. Généralités sur le sol.....	3
1.2. Les microorganismes du sol.....	3
1.2.1. Les bactéries.....	4
1.2.2. Les Protozoaires	4
1.2.3. Les Algues	4
1.2.4. Les Actinomycètes	5
1.2.5. Les champignons.....	5
1.3. Effets du sel sur la flore microbienne du sol.....	5
1.4. Effets de température sur la flore microbienne du sol.....	6
2. Les moisissures	
2.1. Généralités.....	7
2.2. Mode de vie des champignons.....	8
2.2.1. Le saprophytisme.....	8
2.2.2. Le parasitisme.....	8
2.2.3. La symbiose.....	9
A- Les lichens.....	9
B- L'algue.....	9
C- Les mycorhizes.....	9
2.3. Habitat et pathogénicité	9
2.4. Caractères Physiologiques des moisissures	10
2.4.1. L'eau	10

2.4.2. Le pH.....	10
2.4.3. La température	10
2.4.4. L'oxygène.....	11
2.5. Caractères Nutritionnelles.....	11
2.5.1. Les besoins en carbone	11
2.5.2. Les besoins en azote	12
2.5.3. Les minéraux et les facteurs de croissance.....	12
2.6. Classification.....	12
2.6.1. Zygomycètes.....	12
2.6.2. Ascomycètes.....	13
2.6.3. Basidiomycètes.....	13
2.6.4. Deutéromycètes	13
2.7. Intérêts industriels des moisissures.....	13
2.7.1. Intérêt alimentaire.....	13
2.7.2. Intérêt chimique.....	13
2.7.3. Intérêt pharmaceutique et médical	14
2.8. Moisissures halophiles	15
3. Les enzymes	
3.1. Généralités sur les enzymes.....	16
3.2. Origine des enzymes industrielles	16
3.3. La Cellulase.....	17
3.3.1. Les différentes origines de la cellulase.....	17
3.3.2. Utilisation industrielle de la cellulase.....	18
3.4. La protéase	19
3.4.1. Protéases d'origine microbienne.....	19
3.4.2. Applications industrielles des protéases.....	20
3.5. L'amylase.....	21
3.5.1. L' α -amylases d'origine microbienne.....	21
3.5.2. L' α amylase et industrie.....	22

PARTIE 02 : MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. Echantillonnage.....	24
1.2. Détermination du pH des échantillons.....	26
2. Isolement des moisissures.....	26
1.1. Préparation des suspensions- dilutions.....	26
2.2. Ensemencement.....	26
3. Purification.....	26
4. Conservation des souches fongiques isolées	26
5. L'identification des moisissures.....	27
5.1. Identification macroscopique	27
5.2. Identification microscopique	27
6. Mise en évidence d'activités métaboliques.....	28
6.1. La Sélection des souches amylolytiques	28
6.2. La Sélection des souches protéolytiques.....	28
6.2.1. Activité caséinase.....	28
6.2.2. Activité gélatinase.....	28
6.3. La sélection des souches cellulolytiques	29
6.4. Sélection des isolats producteurs de substances antibactériennes.....	29
6.5. Test de l'antagonisme	29
6.5.1. Antagonisme en confrontation directe	30
7. Méthode de fermentation	30
7.1. Substrat de fermentation	30
7.2. Préparation du milieu de culture	30
7.3. Conduite de la fermentation.....	31
8. Dosage de l'activité protéolytique	31
8.1. Principe.....	31
8.2. Réaction enzymatique.....	31
8.3. Protocole de dosage.....	32

PARTIE 03 : RÉSULTATS ET DISCUSSION

1. Echantillonnage.....	33
2. Résultats d'isolement.....	34
3. Résultats de l'identification.....	35
3.1. Identification macroscopique.....	35
3.2. Identification microscopique.....	38
4. Résultats des tests d'activité enzymatique.....	44
4.1. Dégradation d'amylase.....	44
4.2. Dégradation des protéines.....	45
4.2.1 .Dégradation de la caséine.....	45
4.2.2. Dégradation de la gélatine.....	48
4.3. Dégradation de la cellulose.....	49
5. Résultats de test de l'activité antibactérienne.....	51
6. Résultats des tests d'antagonisme.....	54
7. Fermentation de la souche sélectionnée.....	62
7.1. Résultats du PH.....	62
7.2. Résultats de l'activité protéolytique.....	63
CONCLUSION	68
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	70
ANNEXES	
RÉSUMÉS	

Liste des abréviations

PDA: Potato Dextrose AGAR

pH: Potentiel d hydrogene

% : Pourcentage

g : Gramme

°C : Degrés Celsius

NaCl : Chlorure de sodium

TCA: TriChloroacetic Acid.

µg : microgramme.

rpm : rotation par minute.

U : Unité.

ml : millilitre.

mm : millimètre

Cm : centimètre

l : litre.

FMS : Fermentation sur milieu solide.

CMC: Carboxyméthylcellulose

Liste des figures

	Pages
Figure 1: La tolérance des microorganismes aux concentrations de sels (NaCl) : PR-6 <i>Agmenellum quadraplicatum</i> ,Fs <i>Fabrea saline</i> ,Ds <i>Dunaliella salina</i> , Ah <i>Aphanothece halophytica</i> ,H <i>Halobacterium</i> d'après DasSarma et Arora (2001).....	6
Figure 2: structure de l'hyphe chez les moisissures : (a) mycélium non septé, (b) mycélium septé (Botton et <i>al.</i> , 1990).....	7
Figure 3: Schématisation de la reproduction asexuée et sexuée d'une moisissure.....	8
Figure 4: Carte d'Algérie montrant la région d'échantillonnage (Biskra).....	24
Figure 5: Sites d'échantillonnage ; 1 : sol de lac ,2 : sol de palmeraie.....	25
Figure 6: Le dépôt de l'échantillon sur la feuille d'aluminium stérile.....	25
Figure 7: Pourcentage mycoflore isolée des deux échantillons du sol.....	42
Figure 8: Photos représentant les résultats de l'activité amylolytique.....	43
Figure 9: Photos représentant le résultat de l'activité de la caséinase.....	44
Figure 10: Photos représentant les résultats de l'activité de la gélatinase.....	47
Figure 11: Résultats attendus après réalisation des tests par la méthode des disques.....	50
Figure 12: Résultats de test de l'activité antibactérienne.....	50
Figure 13: <i>Alternaria sp</i> (A) vis-à-vis <i>Aspergillus niger</i> (D) ; <i>Penicillium sp</i> (B ₁); <i>Trichoderma sp</i> 1 (A ₃) <i>Aspergillus flavus</i> (B ₂) ; <i>Trichoderma sp</i> 2(I) ; <i>Aspergillus fumigatus</i> (K).....	52
Figure 14: <i>Aspergillus flavus</i> (B ₂) vis-à-vis <i>Alternaria sp</i> (A) <i>Aspergillus fumigatus</i> (K);	

Penicillium sp (B₁) ; Trichoderma sp1 (A₃) ; Aspergillus niger (D); Trichoderma sp2(I)... 53

Figure 15 : *Penicillium sp (B₁) vis-à-vis Aspergillus niger(D) ;Alternaria sp*

(A);Aspergillus flavus(B₂) ; Trichoderma sp 1(A₃) ; Aspergillus fumigatus(K) ;

Trichoderma sp.(I)..... 54

Figure 16 : *Trichoderma sp1 (A₃) vis-à-vis Aspergillus niger(D) ;Alternaria sp(A)*

;Aspergillus flavus(B₂); Penicillium sp (B₁); Trichoderma sp2(I) ; Aspergillus

fumigatus(K)..... 55

Figure 17: *Trichoderma sp2(I) vis-à-vis Aspergillus niger(D) ;Alternaria sp(A)*

; Aspergillus flavus(B₂) ; Penicillium sp (B₁); Trichoderma sp1(A₃) ; Aspergillus

fumigatus(K)..... 56

Figure 18: *Aspergillus niger (D) vis-à-vis Alternaria sp (A) ; Aspergillus flavus (B₂) ;*

Penicillium sp(B₁) ; Trichoderma sp (A₃); Aspergillus fumigatus (K) ; Trichoderma sp2(I). 57

Figure 19 : *Aspergillus fumigatus (K) vis-à-vis Alternaria sp(A) Aspergillus niger (D) ;*

Penicillium sp(B₁) ; Trichoderma sp1(A₃) ; Aspergillus flavus(B₂) ; Trichoderma sp2(I).... 58

Figure 20 : Réalisation de fermentation dans des erlenmeyers de 250ml pour les différent température en fonction de concentration d'NaCl..... 63

Figure 21 : Résultats de l'activité protéolytique pour la souche cultivée sous la température 30°C..... 64

Figure 22: Résultats de l'activité protéolytique pour la souche cultivée sous la température 37°C..... 65

Figure 23: Résultats de l'activité protéolytique pour la souche cultivée sous la température 53°C..... 65

Liste des tableaux

	pages
Tableau 1: Nombre de microorganismes du sol par gramme, en fonction de la profondeur (Alexandre, 1991).....	3
Tableau 2: Catégories de moisissures selon la température de développement (Roquebert, 1997).....	11
Tableau 3: Exemples des microorganismes producteurs de la cellulase (Béguin et Aubert, 1992).....	18
Tableau 4: Les Applications industrielles de la cellulase.....	19
Tableau 5: Exemples des protéases microbiennes (Belmessikh et <i>al.</i> , 2011).....	20
Tableau 6: Quelques protéases fongiques et leurs applications industrielles.....	21
Tableau 7: Les principaux microorganismes producteurs de l' α -amylases.....	22
Tableau 8: Applications industrielles de L' α amylase.....	23
Tableau 9: Caractéristiques des échantillons.....	34
Tableau 10: Le nombre des souches fongiques poussées sur les trois milieux de culture...	35
Tableau 11 : Etude macroscopique des isolats fongiques cultivés sur milieu PDA.....	36
Tableau 12: Caractères microscopiques des souches sélectionnées.....	39
Tableau 13: Mise en évidence de l'activité protéolytique exocellulaire sur le lait gélosé à 20%.....	46
Tableau 14: Résultats des activités enzymatique des 07 souches étudiées.....	49
Tableau 15: Diamètre de la zone d'inhibition développée par l'ensemble des isolats sur la bactérie teste.....	51
Tableau 16: Résultats du pH pour la souche sélectionnée après fermentation.....	60
Tableau 17 : Résultats de l'activité protéolytique.....	61

INTRODUCTION

Aujourd'hui les microorganismes sont des participants majeurs dans plusieurs industries : pharmaceutiques, agroalimentaires et chimiques (Demain, 2000). Parmi ces êtres vivants, les moisissures disposent de possibilité d'applications biotechnologiques très étendues par leur capacité à conquérir des substrats naturels grâce à une dissémination efficace, une croissance rapide et un arsenal enzymatique très développé (Leveau et Bouix, 1999).

La connaissance de la biologie des moisissures est encore partielle. Cependant, la compréhension des métabolismes primaires et secondaires et de la génétique de ces microorganismes permet de maîtriser de mieux en mieux leurs capacités de synthétiser un grand nombre de substances complexes économiquement très importantes : acides organiques, alcaloïdes, antibiotiques, terpènes et enzymes (Sheikh, 2010 ; Mehravar et Sardari, 2011 ; Pereira et *al.*, 2013).

Environ 40% des enzymes industrielles sont d'origine fongique (Botton et *al.*, 1990). Appartenant aux enzymes de la famille des hydrolases telles que, l' α -amylase, la cellulase, la protéase sont parmi les plus importantes enzymes à l'échelle industrielle, ce qui les rendent l'un des outils-clés des biotechnologies (Little, 2004).

L'industrie exige l'emploi d'enzymes thermostables qui ont la capacité de supporter des températures élevées. Pour répondre à cette exigence, l'isolement des moisissures de régions arides peut constituer une alternative intéressante permettant d'obtenir des souches productrices de ce type d'enzymes. En effet, plusieurs études ont été réalisées dans ce sens afin de sélectionner des souches révélant une potentialité intéressante (Bouchet et *al.*, 1999).

En Algérie, les sols sahariens se sont révélés très diversifiés en moisissures et de nombreux travaux ont été publiés sur ces microorganismes, du point de vue taxonomique dans le but de découvrir de nouvelles espèces (Zitouni et *al.*, 2004; Boubetra et *al.*, 2013a,b et 2015; Aouiche et *al.*, 2015; Bouras et *al.*, 2015).

En considérant cette richesse des sols sahariens en moisissures halophiles, nous avons ciblés les sols salés de la région de *SEBKHA* d'*EL M'GHIER* au sud de Biskra ;

Dans ce cadre les objectifs de notre travail s'articulent sur :

- L'isolement des souches fongiques à partir du sol prélevé de *SEBKHA* d'*EL M'GHIER* au sud de Biskra ;
- La purification et l'identification des isolats obtenus ;

INTRODUCTION

- La mise en évidence de l'activité antibactérienne de ces isolats sur un milieu *Mueller Hinton* ;
- La réalisation du test d'antagonisme des isolats fongique (champignon- champignon) ;
- L'étude de la capacité de souches fongiques isolées à produire quelques enzymes sur différents milieux gélosé ;
- La production des protéases alcalines par une seule souche sélectionnée après fermentation en milieux solides incubés à différentes températures, en utilisant les déchets de tomate comme substrat de base supplémenté par différentes concentration d'NaCl ;
- Dosage de l'activité protéolytique des extraits bruts obtenus.

1. Le Sol

1.1. Généralités sur le sol

Le sol représente la couche superficielle de la croûte terrestre résultant de la transformation de la roche mère initiale sous l'effet de phénomènes physiques, chimiques et biologiques dont l'action se poursuit de nos jours (LeClech, 2000), et enrichi par des apports organiques. On différencie le sol de la croûte terrestre par la présence significative de vie. Il est également, un des puits de carbone planétaire, mais semble perdre une partie de son carbone de manière accélérée depuis les 20 dernières années (Ben Bond *et al.*, 2010).

Le sol a de nombreuses fonctions, il est un milieu biologique dans et sur lequel se développent des organismes vivants. Ce développement dépend de la qualité de ce sol ou fertilité (quantité de carbone, d'azote, capacité d'échange ionique, etc.). Il est aussi un acteur déterminant du cycle de l'eau (stockage et régulation) et de la qualité de cette eau (source de pollution, capacité de rétention des polluants mais aussi biodégradation de ceux-ci). Mais le sol joue aussi un rôle prédominant dans tous les cycles biogéochimiques (Quénéa, 2004).

1.2. Les microorganismes du sol

Le sol héberge un très grand nombre de microorganismes (Nannipieri *et al.*, 2003), composés de bactéries, de champignons, d'Actinomycètes, d'Algues et de Protozoaires. Le tableau 1 rappelle brièvement et très schématiquement quelques ordres de profondeurs.

Tableau 1: Nombre de microorganismes du sol par gramme, en fonction de la profondeur (Alexandre, 1991).

Profondeur (cm)	Bactéries	Actinomycètes	Mycètes	Algues
3 à 8	9 750 000	2 080 000	119 000	25 000
20 à 25	2 179 000	545 000	50 000	5 000
35 à 40	570 000	49 000	400 000	500
65 à 75	11 000	5 000	6 000	100
135 à 145	1 400	-	3 000	-

1.2.1. Les bactéries

Les bactéries du sol sont dominantes Gram positif, avec pour groupes principaux : les Corynébactéries, les Actinomycètes, les Mycobactéries, les Nocardiformes. Les genres les plus communs sont : *Arthrobacter*, *Achromobacter* et *Bacillus*, dans les couches aérobie. Alors que les bactéries du genre *Clostridium* sont dominantes dans les conditions anaérobies (Bousseboua, 2002).

De part leurs consommation et minéralisation des matériels organiques, elles représentent la plupart des flux d'énergie à travers le sol. Les bactéries interviennent dans un grand nombre de processus, et d'interaction mutualistes ou antagonistes avec les autres organismes du sol. Elles jouent un rôle fondamental dans les cycles de l'azote (ammonification, nitrification, dénitrification, fixation symbiotique de l'azote), du carbone (décomposition et minéralisation) du phosphore, du soufre, et dans le recyclage des déchets et des polluants comme les pesticides. Elles interviennent également dans le maintien de la structure du sol, par la formation d'agrégats (Djibril, 2003).

1.2.2. Les Protozoaires

Les genres de protozoaires du sol sont les même que ceux des environnements aquatiques. Très peu sont exclusivement trouvés dans le sol. Les espèces les plus communes sont: *Heteromita globosa*, *Colpoda cucullus* et *Hartmanella hyalina*. Ce sont des consommateurs de bactéries, de levures et de champignons, ils sont impliqués aussi dans la décomposition de la matière organique (Maier et al., 2000).

1.2.3. Les Algues

Les algues sont confinées à la surface du sol (Wild, 1993) ou aux quelques centimètres supérieurs. Un grand nombre d'espèces a été isolé des sols mais seulement quelques-unes sont communes : *Chlorococcum humicola* et quelques *Oedogonium* et *Vaucheria*, elles sont inconnues dans les eaux. Les formes du sol sont habituellement plus petites que celles aquatiques, la plupart sont cosmopolites (ex : *Hantzschia amphixus*, des espèces de *Nostoc*, *Chlamydomonas*, *Stichococcus*, *Zygogonium*, *Hormidium*).

1.2.4. Les Actinomycètes

Les Actinomycètes sont des bactéries filamenteuses hétérotrophes et la plupart sont des gram-positifs. Leur rôle dans le sol est important en raison de leur aptitude à dégrader les substances organiques non biodégradables par les champignons et les bactéries (Crawford, 1993), et à produire des substances pro-biotiques et antibiotiques (Kieser et *al.*, 2000).

1.2.5. Les champignons

Les champignons jouent un rôle très important dans les chaînes alimentaires complexes du sol, par leurs interactions trophiques avec la faune et les autres microorganismes du sol, comme source de nourriture mais aussi comme parasites ou prédateurs. Ils jouent un rôle dans le recyclage des déchets, des sécrétions chimiques et excréments des racines des plantes, des animaux et des microorganismes (Djibril, 2003).

L'évaluation de la biomasse des microorganismes a montré que dans la plupart des sols, les mycètes sont le composant principale (Bååth and Söderström, 1980 ; Schnürer et *al.*, 1985). Certaines espèces fongiques se retrouvent sur la plupart des terrains, comme les *Aspergillus*, *Penicillium*, *Epicoccum*, *Fusarium*, *Trichoderma*, *Mucor*, *Absidia*, *Rhizopus*, *Mortierella*, *Zygorhynchus*, *Chaetomium*, *Gymnoascus*, etc. (Boiron, 1996).

Comme les bactéries, les mycètes sont importants pour immobiliser, ou maintenir, des aliments dans le sol. En outre, les mycètes aident à augmenter l'accumulation de la matière organique riche d'acide humique qui est résistante à la dégradation et peut rester dans le sol pour des centaines d'années (Christensen, 1989 ; Senal et *al.*, 1993 ; Prescott et *al.*, 1995).

1.3. Effets du sel sur la flore microbienne du sol

Dans la nature, la plupart des cas de salinité sont dus aux sels de sodium et surtout au NaCl (Senal et *al.*, 1993). La haute salinité compromet des fonctions biologiques dans les écosystèmes et cause la dégradation des ressources de sol et de l'eau (Tanji, 1990 ; 1996 ; Sumner and Naidu, 1998 ; Sumner, 2000 ; DasSarma and Arora, 2001 ; Anonyme e, 2004).

Bien que, les océans soient de loin, la plus grande eau superficielle saline des environnements hyper salins (3.5% sels totaux). Ce processus mène les diverses espèces microbiennes à s'adapter

aux différentes gammes de salinités (Figure 1), pendant que la saumure est concentrée de 1 mol/L à 3.5 mol/L (DasSarma et Arora, 2001). Les mycètes ont été découvertes dans les environnements dont la salinité s'étend entre 15- 32% de NaCl, où jusqu'ici supposé que seules les bactéries pouvaient se développer (GundeCimerman et *al.*, 2002).

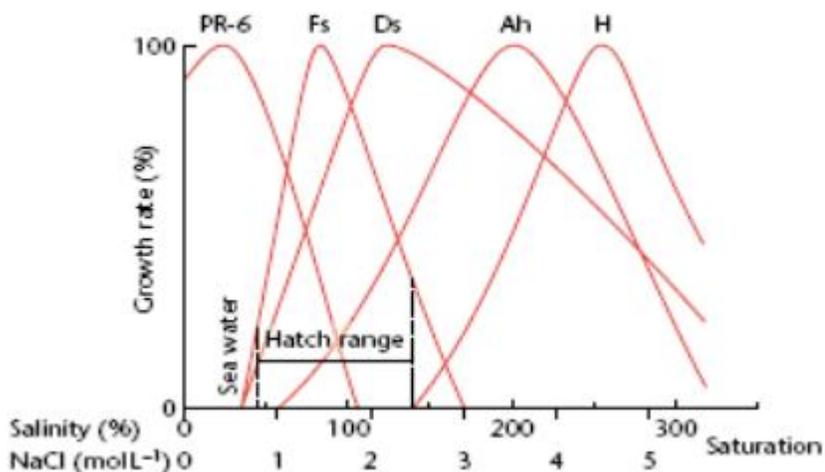


Figure1: La tolérance des microorganismes aux concentrations de sels (NaCl) : **PR-6** *Agmenellum quadruplicatum*, **Fs** *Fabrea saline*, **Ds** *Dunaliella salina*, **Ah** *Aphanothece halophytica*, **H** *Halobacterium* d'après DasSarma et Arora (2001).

1.4. Effets de température sur la flore microbienne du sol

Parmi les organismes eucaryotes, seulement quelques espèces de mycètes peuvent se développer à des températures situées entre 45 °C et 55 °C (Cooney et Emerson, 1964). Par ailleurs, Tansey et Brock (1978) ont répertorié 30 espèces fongiques croît à des températures élevées modérément (60°C à 62°C).

Les mycètes thermophiles ont une température de croissance minimale inférieure à 20°C et maximale supérieure à 50 °C (Brock, 1995 ; Blochl et *al.*, 1997 ; Maheshwari et *al.*, 2000). En outre, la majorité de mycètes thermophiles appartiennent aux Zygomycètes (*Rhizomucor miehi*, *R.pussillus*), Ascomycètes (*Chaetomium thermophile*, *Thermoascus aurantiacus*, *Dactylomyces thermophilus* , *Melanocarpus albomyces*, *Talaromyces thermophilus*, *T. emersonii*, *Thielavia terresteris*), Basidiomycètes (*Phanerochaet chrysosporium*) et Hyphomycètes (*Acremonium almbamensis*, *A. thermophilum*, *Myceliophthora thermophila*, *Thermomyces laginosus*,

Seytalidium thermophilum, *Malbranchea cinnamonea*) (Tensey and Brock, 1978 ; Mouchacca, 1997 ; 1999).

2. Les moisissures

2.1. Généralités

Les moisissures sont des eucaryotes à noyaux minuscules. Elles sont des champignons filamenteux hétérotrophes dépourvues de chlorophylle et de pigments assimilateurs et présentent des parois cellulaires composées de la chitine et non de la cellulose, la principale forme de stockage des glucides est le polysaccharide glycogène (Indge, 2004 ; Nicklin et *al.*, 2000). Ces organismes sont des thallophytes ; donc ne possédant pas de racines, ni de tiges, ni de feuilles, se caractérisant par la formation de filaments (*hyphes*) libres ou entrelacés dont l'ensemble est désigné sous le nom de mycélium (Figure2). Celui-ci peut être *coenocytique* (non cloisonné, c'est-à-dire hyphe résultant de divisions nucléaires répétées, sans divisions cellulaires concomitantes), ou bien *septé* (cloisonné) (Genevès, 1990 ; Genevès, 1992 ; Bouchet et *al.*, 1999 ; Boiron, 2005).

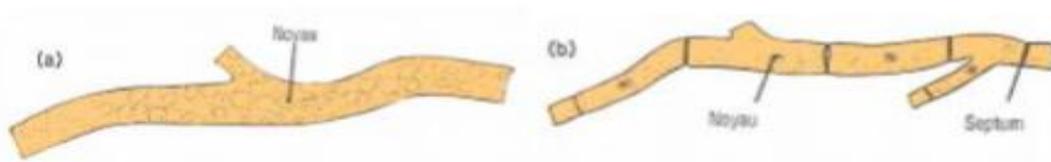


Figure 2 : Structure de l'hyphe chez les moisissures : (a) mycélium non septé, (b) mycélium septé (Botton et *al.*, 1990)

Les spores représentent le mode de reproduction le plus commun chez les moisissures. On distingue, selon leurs origines, les spores sexuées et les spores asexuées (Figure3) ; ces dernières dites aussi formes imparfaites ou anamorphes sont uni- ou pluricellulaires et produites soit dans des sporanges soit à partir de cellules d'hyphes appelées cellules conidiogènes (Raven et *al.*, 2000). La nutrition s'effectue à travers des haustoria, c'est-à-dire des tubes suçoirs (Bouchet et *al.*, 1999).

Celles qui sont sexuées ou téléomorphe, apparaissent souvent en fin de saison sous forme de gamètes à la suite d'une méiose. Cette reproduction sexuée est très variable tant sur le plan de la

diversité des organes que sur celui des cycles de développement. La fécondation peut s'effectuer chez un même individu (homothallisme) ou entre deux individus différents (hétérothallisme) (Sterullu, 1991).

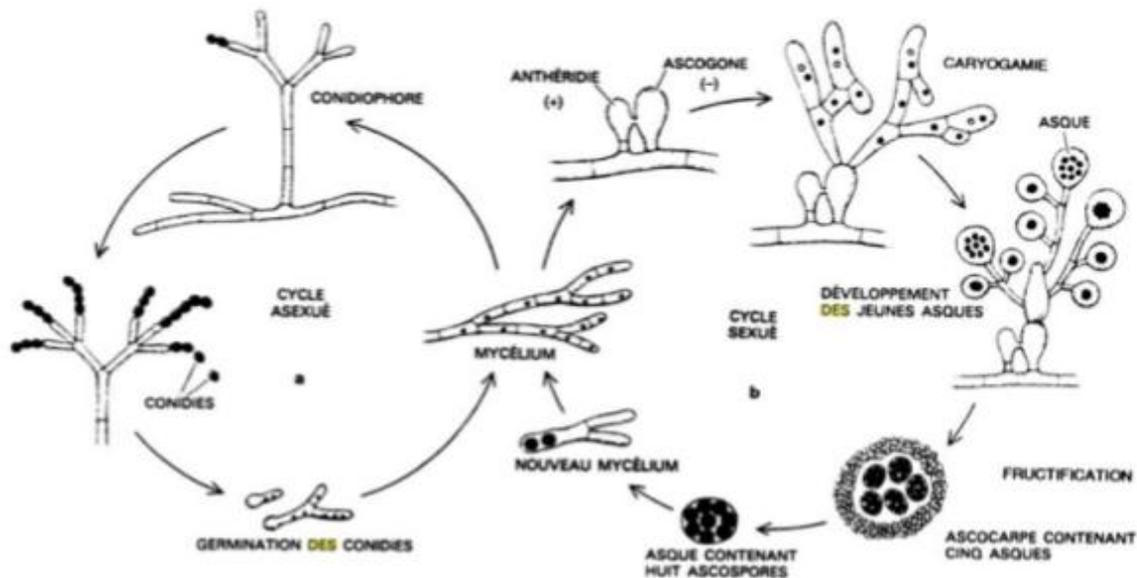


Figure 3 : Schématisation de la reproduction asexuée et sexuée d'une moisissure.

2.2. Mode de vie des champignons

Indépendamment du classement hiérarchique en plusieurs groupes et sous-groupes, les champignons sont classés selon leur mode de vie en trois grandes catégories : les saprophytes, les parasites et les symbiontes.

2.2.1. Le saprophytisme : Les espèces saprophytes se développent aux dépens des substances mortes d'origines animale ou végétale (Bouchet et *al.*, 1999). Ces espèces jouent un rôle essentiel au sein des cycles biologiques en minéralisant les matières végétales ou animales mortes (Marouf et Reynaud, 2007).

2.2.2. Le parasitisme : Plusieurs champignons mènent une vie parasite vis-à-vis des substances organiques (Florent, 1993). Le parasitisme est généralement nuisible et souvent nocif.

C'est le cas des espèces responsables de maladies sur les végétaux tel que l'oïdium (blanc) (Bouchet et al ; 1999).

2.2.3. La symbiose : Raven et *al.*, (2000) ; Marouf et Reynaud (2007), définissent la symbiose comme une association étroite et durable entre les organismes d'espèces différentes, pouvant appartenir à des règnes différents, vivant en équilibre les uns avec les autres et tirant les bénéfices mutuels de cette union, mais pouvant vivre séparément. Leurs états de symbiose sont :

A- Les lichens sont constitués d'une association entre champignon (principalement du phylum *Ascomycota*) et une cyanobactérie.

B- L'algue, capable de photosynthèse, va fournir les molécules organiques carbonées au champignon qui en retour fournira les éléments minéraux à l'algue.

C- Les mycorhizes sont constitués d'une association entre un champignon et la racine d'une plante. Les mycorhizes constituent la forme de symbiose la plus répandue à l'échelle planétaire. On estime que 90% des végétaux contractent spontanément cette association. Les champignons vont développer un réseau de filaments mycéliens à partir de la racine et vont être impliqués dans la nutrition minérale des plantes. C'est d'ailleurs une association symbiotique qui aurait permis aux plantes de coloniser le milieu terrestre.

2.3. Habitat et pathogénicité

Lorsque les conditions environnementales sont favorables (humidité, température et substrats organiques disponibles), les moisissures se développent. Beaucoup d'espèces se reproduisent dans les habitats froids, périodiquement arides ou autres, apparemment inhospitaliers (Isaac et *al.*, 1993). Il est important de souligner que les conditions optimales pour la croissance et la reproduction des moisissures changent considérablement d'une espèce fongique à une autre, d'où une biodiversité de mycètes qui tend à augmenter dans les régions tropicales, certains sont spécifiques à des endroits étroitement limités (la truffe blanche de Piémont est connue uniquement au niveau d'une Provence de l'Italie nordique) (Swann et *al.*, 1999). Environ 70.000 espèces de mycètes sont décrites. L'intervention néfaste des champignons filamenteux se manifeste essentiellement dans l'industrie alimentaire avec une activité phytopathogène en particulier sur les fruits et légumes.

Les moisissures les plus connues pour leur pathogénicité sont : *Aspergillus flavus*, *A. nomius* et *A. parasitica* connus pour leur production d'aflatoxine (substance cancérigène puissante). Ces espèces se développent à la surface de certains aliments tels que les céréales et les arachides (Guiraud, 1998), la moisissure *Penicillium citreonigrum* produit la **citroviridine** (mycotoxine neurotoxique responsable du bériberi cardiaque), alors que *P.citrinum* produit la citrinine un néphrotoxique, *Fusarium sporotrichoides* et des espèces voisines produisent divers toxines comme les trichothécènes, la zéaralénone, les fumonisines, etc. Certaines de ces toxines sont très thermostables (30 min à 200°C).

Certaines maladies dues à l'aleucie alimentaire toxique (ATA) se présentent sous forme de simples malaises (Guiraud, 1998). D'autres exemples existent encore, telle que l'action de *Cryphonectria parasitica* responsable de la cessation de quatre milliards d'arbres de châtaigne aux Etats-Unis (Alexopoulos et al., 1996).million d'espèces (Hawksworth, 1991 ; Hawksworth et al., 1995).

2.4. Caractères Physiologiques des moisissures

Un certain nombre de caractères physiologiques permettant de définir les moisissures. Parmi ces facteurs, on distingue :

2.4.1. L'eau : Les champignons peuvent en général se développer dans des milieux à la pression osmotique relativement élevée, tels que les milieux riches en sucres ou en sel, où les bactéries ne peuvent croître (Bousseboua, 2002).

2.4.2. Le pH : Les moisissures croissent dans une large gamme de pH, 5.5-7.5, avec préférence pour les milieux acides (pH=5) et, par leurs activités métaboliques (la respiration et la sécrétion d'acide organique), acidifient encore plus le milieu (Nicklin et al., 2000).

2.4.3. La température : La plupart des moisissures sont mésophiles et croissent à des températures entre 5°C et 40°C. Certains sont psychrophiles et sont capables de vivre à moins de 5°C, d'autre sont thermotolérants ou thermophiles et peuvent croître au-dessus de 50°C (Tableau 02) (Nicklin et al., 2000).

Tableau 02: Catégories de moisissures selon la température de développement (Roquebert, 1997).

Types de champignons	Gamme de température	Température optimale
Mésophiles	0 à 50°C	15 à 30°C
Thermophiles	20 à 50°C	35 à 40°C
Thermotolérants	0 à 50°C	15 à 40°C
Psychrophiles	0 à 20°C	0 à 17°C

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

2.5. Caractères Nutritionnels

Les moisissures comme tous les êtres vivants se nourrissent. Ils ont donc besoin d'une source de carbone, d'énergie, d'azote et d'oligo-éléments.

2.5.1. Les besoins en carbone

Les moisissures sont des organismes qui utilisent des matériels organiques comme sources de carbone. Le glucose, le fructose, le mannose, le galactose, le maltose, le saccharose, l'amidon et la cellulose représentent les sucres les plus utilisés par les moisissures comme source de carbone et d'énergie. La plupart d'entre elles peuvent métaboliser le glucose et le saccharose avec quelques polysaccharides comme l'amidon et la cellulose (Boiron, 1996 ; Nicklin et al., 2000). D'autres composés organiques tels que les pesticides, les hydrocarbures, la lignine, la pectine et les lipides sont également dégradés par les moisissures à côté d'autres substrats organiques bon marché comme les déchets issus de l'industrie agroalimentaire (lactosérum, mélasses de canne ou de betterave, amidon de maïs, déchets d'agrumes, etc.) (Nishio et Nagai, 1981 ; Joyeau, 1982).

2.5.2. Les besoins en azote

Les moisissures incorporent l'azote par hétérotrophies. Ils ne peuvent assimiler l'azote gazeux mais peuvent utiliser le nitrate, l'ammonium, l'urée et certains acides aminés par absorption directe à travers la membrane. Des sources complexes d'azote, comme les peptides et les protéines, ne sont utilisables par les hyphes qu'après leur dégradation par des protéases en acides aminés (Nicklin et *al.*, 2000).

2.5.3. Les minéraux et les facteurs de croissance

Le cuivre, le magnésium, le sodium, le zinc et le molybdène constituent les micronutriments, et sont disponibles en grande quantité dans l'environnement des moisissures (Nicklin et *al.*, 2000). Ils sont nécessaires à la plupart des espèces fongiques pour la production de cytochromes, des pigments, d'acides organiques etc (Boiron, 1996).

Certaines moisissures ont besoin de facteurs de croissance pour leur nutrition et leur croissance (Leclerc et *al.*, 1995), tels que les vitamines ; en particulier la thiamine et la biotine. Les stéroïdes, les acides gras, les purines et les pyrimidines (Nicklin et *al.*, 2000).

2.6. Classification

Les moisissures ne correspondent pas à un groupe systématique homogène, mais se situent en diverses familles de champignons microscopiques. Leur classification est basée sur des caractères morphologiques (structure du mycélium) et le mode de reproduction (Davet, 1996). 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

2.6.1. Zygomycètes

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).

2.6.2. 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 moisissures et des végétaux (Guiraud, 1998). Elles sont cependant plus particulièrement nombreuses dans l'ordre des *Eurotiales*, des *Microscaleles* et des *Sphaeriales*. Dans cette classe, le genre le plus connu est *Endothia* et *Neurospora* (Bourgeois, 1998).

2.6.3. Basidiomycètes

Les basidiomycètes regroupent seulement 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). Les basidiomycètes sont couramment appelés « champignons à chapeau

2.6.4. 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.

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

2.7. Intérêts industriels des moisissures

Actuellement, les moisissures jouent un rôle primordial dans divers domaines d'applications dans l'industrie. Cependant cette dernière n'exploite commercialement qu'un petit nombre de métabolites de quelques espèces seulement (Boiron, 1996).

2.7.1. Intérêt alimentaire

Les champignons filamenteux sont des producteurs importants d'acides organiques tels que l'acide gluconique, l'acide malique, l'acide acétique et l'acide citrique (Leveau et Bouix, 1993 ; Boiron, 1996). Ce dernier est notamment produit par *Aspergillus niger*, où 60% de sa production est destinée au secteur alimentaire (Botton et al., 1999).

La production de biomasse peut être une source importante pour l'alimentation animale et même humaine, en servant de complémentation des produits céréaliers. Quelques espèces fongiques ont un grand usage, c'est le cas d'*Aspergillus niger*, de *Fusarium graminearum* et de *Trichoderma harzianum* (Botton et al., 1999; Larpent- Gourgau et Sanglier, 1992 ; Delgado-Jarana et al., 2002).

Par ailleurs, *Aspergillus niger* 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).

2.7.2. 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). Certains genres fongiques tels que *Aspergillus*, *Mucor* et *Penicillium* sont capables de produire des lipides en quantités importantes et constituent une source potentielle d'utilisation chimique (Botton et al., 1999).

Cependant, certaines moisissures possèdent d'intéressantes propriétés ; *Aspergillus ochraceus*, *Penicillium funiculosum* et *Rhizopus arrhizus* sont capables d'absorber de l'uranium du minerai.

En biotransformation les moisissures ont une zone étroite d'application. Un exemple remarquable est l'hydrolyse enzymatique de la pénicilline V par *Penicillium chrysogenum* et *Fusarium* entraînant la formation d'acide amino-6-pénicillanique qui est un intermédiaire important de la production de pénicillines semi synthétiques telles que l'ampicilline et l'amoxicilline (Durand et Monson, 1988).

2.7.3. Intérêt pharmaceutique et médical

Les champignons filamenteux sont des grands producteurs d'antibiotiques tel que la pénicilline produite par le genre *Penicillium* et la céphalosporine produite par *Cephalosporium* (Larpend-Gourgaud et Sanglier, 1992 ; Botton et al., 1999). La production industrielle en vitamines se limite à une partie de la synthèse de la riboflavine produite spécialement par *Eemothecium ashbyii* 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).

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).

2.8. Moisissures halophiles

Le mot halophile est composé de deux parties "hals" qui veut dire le sel et "phil" qui veut dire aime de ce fait les moisissures halophiles sont définies comme des microorganismes qui vit et se multiplier seulement dans un milieu à forte concentration de sel (Edgerton et Brimblecomz, 1981). Elles peuvent être classées selon le degré de leurs besoin en sel (Shiladitya et al, 2012 ; Pitt et Hocking, 2009).

- **Non halophiles** : Ne tolèrent pas plus de 0,2 M de NaCl
- **Halotolérants** : Tolèrent de 0,2 à 0,85 M de NaCl (2-5%)

- **Halophiles modérés** : Supportent des concentrations en NaCl allant de 0,85 jusqu'à 3,4 M (5-20%)
- **Halophiles extrêmes** : Croissent dans l'intervalle de 3,4 à 5,1 (20-30%) de NaCl.

3 .Les enzymes

3.1. Généralités sur les enzymes

Les enzymes sont les catalyseurs du monde biologique. Ce sont des macromolécules de haute masse moléculaire (10 à 100 kda) 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; 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).

Elles sont privilégiées en industrie car elles permettent de contourner les inconvénients des produits chimiques et améliorent les relations coûts-efficacité des procédés (Sandhya et *al.*, 2005).

Selon l'i.U.B, les enzymes sont répertoriées en six classes.

- Classe 1 : Oxydoréductases.
- Classe 2 : Transférases.
- Classe 3 : Hydrolases.
- Classe 4 : Lyases.
- Classe 5 : Isomérases.
- Classe 6 : Ligases.

3.2. Origine des enzymes industrielles

Les enzymes industrielles proviennent de source végétale, animale ou microbienne. L'extraction à partir des plantes et des animaux est cependant limitée par des paramètres difficiles à contrôler.

En effet, les principaux avantages des enzymes de production par rapport aux enzymes d'extraction sont une production indépendante des contraintes saisonnières et géographiques, une possibilité d'utilisation de matières premières bon marché, des rendements de production pouvant être augmentés de façon importante par l'amélioration des souches microbiennes et l'optimisation des conditions de production (Scriban, 1993).

3.3. La Cellulase

Selon Jean Pelmont (1995), les cellulases constituent des systèmes enzymatiques capables d'hydrolyser les macromolécules de cellulose en molécules de sucres suffisamment petites pour passer à travers les membranes cellulaires.

3.3.1. Les différentes origines de la cellulase

Les cellulases sont largement répandues dans la nature (Xu et *al.*, 2000). Elles sont recensées chez des organismes très divers : animaux, végétaux, bactéries et champignons (Odier et Rouau 1985). Le (tableau 3) représente des exemples des cellulases d'origine microbienne.

Tableau 3 : Exemples des microorganismes producteur de la cellulase (Béguin et Aubert, 1992).

Microorganismes	Espèces
Moisissures	<i>Neocallimastix frontalis, Sphaeromonas communis, Piromonas commmunis, Chytridomycètes, Trichoderma viridae, T. reesei, T. koningii, Aspergillus aculeatus A.nidulans, A. oryzae, A niger, A. terreus, Fusarium solani, Sporotrichumpulver lentum, Chaetomium cellulolyticum, Humicolain solens</i>
Levures	<i>Candida molischiana, C. pulcherrima, C. stellata, C. wickerhamii, Cryptococcus flavus, Kloeckera apiculata, Kluyveromyces lactis, Rhodotorulaglu, Saccharomyces fibuligeratinis, Trichosporon cutanum</i>
Bactéries	<p>Aérobies : <i>Sporocytophaga, Myxococcoides, Baccillussubtilis, Cellulomonas et Pseudomonas</i></p> <p>Anaérobies strictes : <i>Clostridium thermocellum, C. stercorarium, Ruminococcus albus, R. flavefasciens, Bactéroï des succinogenes</i></p> <p>Anaérobies facultatives : <i>Erwinia chrysantharum</i></p> <p>Anaérobies strictes : <i>Clostridium thermocellum, C. stercorarium, Ruminococcus albus, R. flavefasciens et Bactéroï des succinogenes</i></p>
Actinomycètes	<i>Thermomonospora fusca, Cellulomonas fimi, C.bioazotea, C.uda, Streptomyces drozdowiczii, S.lividans</i>

3.3.2. Utilisation industrielle de la cellulase

Les cellulases étaient commercialement valables pour plus de 30ans, et présentaient une cible pour les recherches académiques comme celles industrielles (Singh.A, 1999 et *al.*, 2007). Son utilisation permet potentiellement la production de glucose, élément de base, qui une fois fermentée permet d'accéder à d'autres substances clés à savoir alcools, acétones et acides organiques notamment des gras volatiles d'où l'importance, écologique et industrielle, considérable des cellulases (Receveur et *al.*, 2002) ce qui revoie à différentes applications industrielles (Tableau 4).

Tableau 4 : Les Applications industrielles de la cellulase.

Industries	Applications
Alimentaires	Les cellulases sont utilisées pour faciliter la filtration de diverses suspensions, riches en fibres cellulosiques (Scriban, 1993). Des traitements de différents produits pour améliorer leurs qualités, où les cellulases sont utilisées sous forme de mélange d'enzymes.
des textiles et des détergents	Elles sont utilisées au cours de la finition, pour donner l'aspect aux vêtements en jean après lavage et améliorer l'apparence des tissus par élimination des tâches (Gusakov et al., 2007). Elles sont utilisées aussi dans les lessives afin d'améliorer l'apparence et la brillance des couleurs (Maurer, 1997 ; Cavako-Paulo, 1998).
Papeterie	Dans la fabrication des pâtes à papier, l'addition de cellulases, aux suspensions de pâtes en cours de lavage et surtout aux suspensions de pâtes de papier de recyclage, améliore significativement leur filtrabilité et conduit à des économies importantes de consommation d'eau (Scriban, 1993).
Nutrition animale	utilisées comme additifs dans l'alimentation animale car l'addition des cellulases, aux aliments pour porcins, améliore leur digestibilité, ce qui réduit l'excrétion de cellulose non digérée (et donc diminue la charge polluante des excréta) (Scriban, 1993 ; Gusakov et al., 2000)
Thérapeutique	L'utilisation quasi confidentielle de certaines cellulases dans des formules médicamenteuses à vocation d'aide digestive (Odier et Rouau, 1985 ; Scriban, 1993).

3.4. La protéase

Les protéases sont un groupe d'enzymes très complexe .Elles appartiennent à la classe des hydrolases (EC 3.4.21-24.x), formées d'une ou plusieurs chaînes polypeptidiques (Kumar et al., 2008). Ces enzymes catalysent le clivage des liaisons peptidiques de toute molécule protéique. 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 hydrolysate de protéines ou d'un mélange d'acides aminés.

3.4.1. Protéases d'origine microbienne

Les protéases peuvent être produites par les moisissures, les levures et les bactéries (Tableau 5)

Tableau 5 : Exemples des protéases microbiennes (Belmessikh et *al.*, 2011).

Sources	Espèces	Références
Moisissures	<i>Aspergillus oryzae</i> <i>Mucor circinelloides</i> <i>Conidiobolus coronatus</i> <i>Penicillium sp.</i> <i>Aspergillus terreus</i> <i>Bauveria felina</i> <i>Aspergillus clavatus</i> ES1	García-Gómez et <i>al.</i> , 2009 Sathya et <i>al.</i> , 2009 Laxman et <i>al.</i> , 2005 Germano et <i>al.</i> , 2003 Wu et <i>al.</i> , 2006 Agrawal et <i>al.</i> , 2005 Hajji et <i>al.</i> , 2007
Levures	<i>Aureobasidium pullulans</i> <i>Candida lypolytica</i>	Chi et <i>al.</i> , 2007 Tobe et <i>al.</i> , 1976
Bactéries	<i>Bacillus licheniformis</i> <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>Bacillus sp.</i> <i>Virgibacillus sp.</i> SK33 <i>Synergistes sp</i>	Ferrero et <i>al.</i> , 1996 George et <i>al.</i> , 1995 Soares et <i>al.</i> , 2005 Patel et <i>al.</i> , 2005 Sinsuwan et <i>al.</i> , 2008 Kumar et <i>al.</i> , 2008)
Actinomycètes	<i>Streptomyces sp.</i> <i>Nocardiopsis alkaliphila sp</i>	Mehta et <i>al.</i> , 2006 Hozzein et <i>al.</i> , 2004

3.4.1. Applications industrielles des protéases

Les principales industries utilisatrices de protéases sont les détergents pour lessives, la tannerie, la biosynthèse industrielle, la laiterie, la panification, la brasserie et l'application médicale et pharmaceutique (Tableau 6) (Durand et Monson, 1982 ; Siezen , 1988 ; Rao et *al.*, 1998).

Tableau 6 : Quelques protéases fongiques et leurs applications industrielles.

Genre	Espèce	Type d'enzyme	Applications industrielles	Références
<i>Aspergillus</i>	<i>niger</i>	p.ac	aide digestive, préparation des souces de soja et	Jernejc et Cimerman(2001). Rugsaseel et <i>al.</i> , (1995). Davidson et <i>al.</i> , (1975). Haussnert et <i>al.</i> , (1996). Dahot (1987) Jernejc et Cimerman (2001) // Dahot, 1987 Botton et <i>al.</i> , (1990)
	<i>oryzae</i>	p.ac, p.n et p.al	panification attendrissage	
	<i>melleus</i>	p.al	des viandes, aide digestive, détergents, brasserie détergents pour lessives	
	<i>candidus</i>	//	//	
	<i>flavus</i>	//	clinique	
	<i>saitoi</i>	p.ac	Affinage des fromages	
	<i>parasiticus</i>	p.al	détergents pour lessives	
	<i>sojae</i>	p.al	préparation des souces de soja	
<i>Endothia</i>	<i>parasitica</i>	p.ac	Coagulation du lait et l'affinage des fromages	Durand et Monson (1982)
<i>Fusarium</i>	<i>culmorum</i>	p.ac	Médicale (phytopathologie)	Urbanek et Yirdaw (1984) Pekkarinen et <i>al.</i> , (2002)
		p.al	Hydrolyse des protéines céréales	
<i>Geotrichum</i>	<i>candidum</i>	p.n	Affinage des fromages	Boiron (1996)
<i>Mucor</i>	<i>bacilliformis</i>	p.ac	Coagulation du lait	Fernandez-Lahore et <i>al.</i> , (1998) Durand et Monson (1982)
	<i>miehei</i>			
	<i>pusillus</i>			
<i>Penicillium</i>	<i>camenberti</i>	p.ac, p.n et p.al	Industrie laitière (affinage des fromages et la coagulation du lait)	Auberger et <i>al.</i> , (1985) Dahot(1987); Dai et <i>al.</i> , (2004).Modler et <i>al.</i> , (1974).Sodek et Hofmann (1970)
	<i>expansum</i>	p.ac p.ac, p.n et		
	<i>requaforti</i>	p.al		
	<i>tanthinellum</i>	p.ac		

3.5. L'amylase

L'amylase est une enzyme hydrolysant l'amidon (Ross, 1976). Elle est constituée d'une α -amylase et d'une β -amylase (Thoma et *al.*, 1971). Il est bien établi que les α -amylases sont synthétisées par les plantes, les animaux et les micro-organismes, tandis que, les β -amylases

sont principalement synthétisées par les plantes (Pazur, 1965 ; Thoma et *al.*, 1971). Plusieurs autres enzymes sont induites en présence de l'amidon, mais ce sont les α -amylases qui dégradent l'amidon en glucose et/ou oligosaccharides, alors que les β -amylases obtiennent du maltose (Thoma et *al.*, 1971).

3.5.1. L' α -amylases d'origine microbienne

Les principaux microorganismes producteurs de l' α -amylases sont consignés dans le tableau 7

Tableau 7 : Les principaux microorganismes producteurs de l' α -amylases.

Microorganismes	Espèces	Références
Moisissures	<i>Penicillium fellutanam</i>	Kathiresan et Mannivanan (2006); Ertan et Balkan (2007).
	<i>Penicillium chrysogenum</i>	
	<i>Rhizopus oryzae</i>	Akbatche et Bariout (2007); Mama (2009); Açouréne et Ammouche (2011).
	<i>Aspergillus niger</i>	
	<i>Alternaria Alternata</i>	Lateef et <i>al.</i> , (2004).
Levures	<i>Candida guilliermondii</i>	Akbatche et Bariout (2007); Mama (2009); Açouréne et Ammouche (2011).
	<i>Candida tropicalis</i>	Tamura (1993).
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
Bactérie	<i>Bacillus licheniformis</i>	Lies et <i>al.</i> , (2000).
	<i>Bacillus subtilis</i>	
	<i>Lanugilnosus thermomyces</i>	
	<i>Lactobacillus casie</i>	
	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	

3.5.2. L' α amylase et industrie

L' α amylase microbiennes sont parmi les enzymes les plus utilisés dans les procédés industriels autres qu'alimentaires (industrie pharmaceutique, textile, papeterie et détergents), en raison de leur productivité et thermostabilité (Burhan et *al.*, 2003)(Tableau 8).

Tableau 8 : Applications industrielles de L'α amylase

Industries	Applications	Référence
Glucoserie	Solubilisation de l'amidon, accompagnée d'une chute importante de la viscosité (liquéfaction).	
Sucrierie	Réduction de la viscosité des sirops de cannes à sucre en hydrolysant les contaminants amylicés pour réussir le processus de cristallisation	
Biscuiterie et panification	Amélioration des propriétés rhéologiques et fermentaires de la pâte, ainsi que le volume de la mie et la coloration de la croûte.	Sicard, (1983)
Industrie textile	Le désencollage textile, qui permet d'éliminer la colle d'amidon qui enduit les fibres et les protège au cours du tissage.	
Papeterie	Liquéfaction de l'amidon pour préparer des sauces de couchage, permettant d'éliminer les irrégularités superficielles de la feuille.	
Détergents	Dégradation des taches à base d'amidon. Les oligosaccharides et les dextrines libérés de l'action hydrolytique sont solubles, par conséquent, la tache est physiquement découpée.	Igarashi et <i>al.</i> , (1998) Nielsen et Borchet, (2000).
Industrie pharmaceutique	-Agent anti-inflammatoire. -Un aide digestif (contre les dyspepsies et les fermentations intestinales).	Nielsen et Borchet, (2000).

Notre partie pratique de ce travail a été réalisée pendant la fin du mois de janvier jusqu'au la fin du mois de Mai au niveau au laboratoire de Microbiologie (RDC), au sein de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Frères *Mentouri Constantine 1*.

1. Echantillonnage

Les échantillons du sol utilisés pour cet objectif sont prélevés à partir de deux sites du *SEBKHA d'EL MGHYAIR*. Le choix de ces endroits repose sur deux critères principaux à savoir ; la température élevée et degré de salinité du sol. En effet, la localité d'*El M'GHIERE* (Figure 4) se trouve à 140 Km au sud de la willaya de Biskra situé dans le sud Algérien.

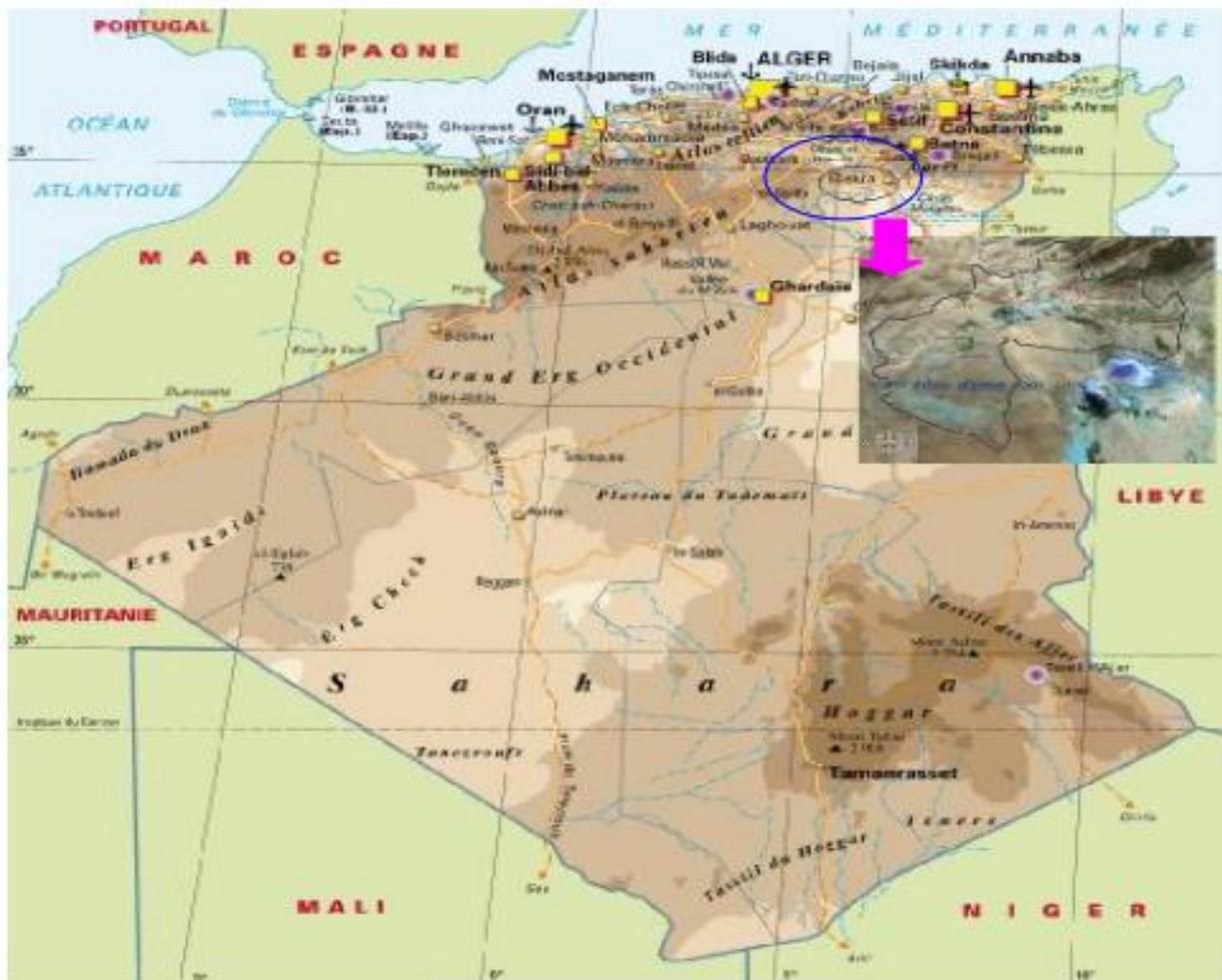


Figure 4 : Carte d'Algérie montrant la région d'échantillonnage (Biskra).

Pour ce faire, 200 à 300 grammes de sol ont été prélevés au niveau :

- Du sol avoisinant le lac à une profondeur de 20 centimètres (Figure 6).
- Du sol des palmeraies distantes de 30 mètres du lac principal et à une profondeur de 50 centimètres (Figure 5).



Figure 5: Sites d'échantillonnage ; 1 : Sol de lac, 2 : Sol de palmeraie.

Les échantillons sont déposés sur une feuille d'aluminium stérile soigneusement enveloppée dans des sacs en papier et stockés à 4°C pour être transportés au laboratoire et analysés dans les 24 heures (Figure 6).



Figure 6: Le dépôt de l'échantillon sur la feuille d'aluminium stérile.

1.2. Détermination du pH des échantillons

La mesure du pH est réalisée dès l'arrivée au laboratoire. La technique consiste à mesurer le pH des suspensions (Pochon et Tradieux, 1962).

2. Isolement des moisissures

L'isolement des mycètes a été réalisé selon la technique des suspension- dilutions et étalement sur milieux gélosés, préconisés par (Davet et Rouxel, 1997).

2.1. Préparation des suspensions- dilutions

La préparation des dilutions consiste, tout d'abord, à préparer la solution mère du sol en ajoutant un gramme de sol dans 9 ml d'eau physiologique stérile (dilution 10^{-1}) et homogénéisé pendant 10 minutes à l'aide d'un vortex. Cette dilution représente la solution mère à partir de laquelle d'autres dilutions sont préparées jusqu'à 10^{-5} (Davet et Rouxel, 1997).

2.2. Ensemencement

Chaque dilution fera guise d'un échantillon et sera étalée en masse et en surface des milieux gélosés (PDA (Annexes 1), Czapek Dox (Annexes 1) et Czapek Dox à concentrations de NaCl : 5%) avec l'addition d'un antibiotique la gentamicine (50ppm) afin d'inhiber la croissance des bactéries (Botton et *al.*, 1990). Les boîtes de pétri sont incubées à 30°C et observées quotidiennement durant 4 semaines.

3. Purification

Après incubation, une mycoflore variée s'est développée. La pureté des souches est vérifiée par repiquage successif sur les différents milieux utilisés pour l'isolement.

Le repiquage consiste à prélever avec une anse de platine stérile un fragment mycélien à la marge du thalle, et de le transférer au centre de la boîte des milieux PDA, Czapeck-Dox et Czapeck-Dox 5% NaCl.

Après cette opération, les boîtes de Pétri sont entourées du papier parafilm et sont mises à incuber à une température de 30°C.

4. Conservation des souches fongiques isolées

La méthode de conservation des souches la plus communément utilisée, consiste à mettre des disques de culture jeunes de chaque moisissure (après 7 jours d'incubation à 30°C) dans un tube d'eau distillée stérile à 20% du glycérol. Par la suite, elles sont stockées dans le congélateur pour favoriser leur viabilité et limiter les possibilités de variations.

5. Identification des moisissures

L'identification des mycètes fait essentiellement appel aux caractères cultureux et à la morphologie, rarement à des propriétés biochimiques. Elle nécessite souvent l'utilisation des milieux favorisant la croissance ou la reproduction et permettant ainsi une expression correcte des caractères à étudier (Botton *et al.*, 1990).

5.1. Identification macroscopique

L'étude macroscopique des isolats fongiques a été effectuée sur milieu PDA, préalablement incubés à 30° C pendant 7 jours. L'examen est effectué à l'œil nu et au loup selon les caractères suivant :

- Texture des colonies : cotonnée, poudreuse, filamenteux, etc.
- Forme des colonies : ovoïde, envahissante, ronde, etc.
- Couleur des colonies : noire, brun, vert, rouge, jaune, etc.
- Couleur du revers des boîtes.
- Vitesse de croissance.

5.2. Identification microscopique

La détermination des moisissures fait appel aux caractères morphologiques des champignons qui sont les suivant :

- Hyphes cloisonnés ou non.
- Mycélium diffus, épais, coloré, incolore.
- Présence de spore.

La technique que nous avons adoptée est comme suit :

- Une goutte de lactophénol bleu coton est déposée sur une lame porte-objet propre.

- Un bout de mycélium est prélevé à partir d'une colonie et déposé sur la goutte de lactophenol bleu coton.

- Recouvrir le frottis d'une lamelle.

Par ailleurs, pour les cultures filamenteuses et poudreuses la méthode utilisée est celle du scotch (test du drapeau), en appliquant un petit morceau de scotch par la face collante sur la colonie à l'aide d'une pince puis déposé sur une lame porte –objet sur laquelle est déposée une goutte de lactophénol bleu coton(Chabasse et *al.*,2002).

L'observation microscopique est effectuée aux grossissements x40 et à l'immersion (Botton et *al.*, 1990).

6. Mise en évidence d'activités métaboliques

6.1. La Sélection des souches amylolytiques

La recherche de l'activité amylolytique est réalisée avec les souches purifiées. La détection est effectuée sur milieu PDA (Annexe1), additionné d'amidon soluble à 1%. Les boîtes sont incubées à 30°C pendant 7 jours. Après incubation, une solution de *lugol* dilué est vaporisée sur la surface de la boîte pendant 30 secondes(Annexe2). La solution *lugol* contenant l'iode qui se complexe avec l'amidon et donne un précipité bleu sombre. Les souches à halo clair sur le pourtour, sont considérées comme productrices d'amylases. Le diamètre des zones d'hydrolyse, est pris en considération pour la sélection de la souche amylolytique la plus performante (Tatsinkouetal., 2005 et Benaouida., 2008).

6.2. La Sélection des souches protéolytiques

6.2.1. Activité caséinase

Afin de mettre en évidence leurs activités caséinolytiques, les souches obtenues ont été ensemencées sur le milieu sélectif (lait gélosé 20%) (Annexe1) par un repiquage au centre ; l'incubation à lieu dans une étuve à 30°C.

La présence d'une activité protéolytique se traduit par l'apparition d'une zone claire autour de la colonie productrice (Anagnostakis et Hankin, 1975 ; Harrigan et McCance, 1976).

6.2.2. Activité gélatinase

Ce test a été réalisé sur le milieu nutritif gélosé contenant 1% de gélatine (Annexe1) selon la méthode de *Williams* et *Cross* (1971). Le milieu est coulé dans des boîtes de Pétri puis ensemencé par repiquage au centre de la boîte et incubé à 30°C. Une solution de chlorure de mercure (Annexe 2) permet de mettre en évidence la dégradation de gélatine, qui se traduit par la présence d'une auréole claire autour des colonies.

6.3. La sélection des souches cellulolytiques

La mise en évidence de l'activité cellulolytique des moisissures isolées est réalisée en milieu solide. La technique la plus évidente serait de faire apparaître la capacité des moisissures à assimiler la cellulose sur un milieu gélosé à base de cellulose (Annexe1), comme seule source carbonée. Le milieu est coulé dans des boîtes de Pétri puis ensemencé par un repiquage au centre de la souche à tester et incubé à 30°C. Après 14 jours, une solution aqueuse de rouge *Congo* à 1% (Annexe 2) versée sur la culture et laissée 15 mn, permet de mettre en évidence la dégradation de la cellulose (*Pinky et al.*, 2012).

6.4. La sélection des isolats producteurs de substances antibactériennes

Le test de l'activité des isolats identifiés consiste à rechercher son effet antibactérien sur le développement de la bactérie test : *E. coli*.

Un écouvillon stérile trempé dans la suspension bactérienne standardisé a servi à ensemencer uniformément toute la surface de la boîte de milieu *Mueller Hinton*.

Après séchage de la surface (environ 5 min), des disques de 5 mm de diamètre d'une colonie mycélienne de 6 à 9 jours (suivant le développement) réactivée sur PDA sont déposés sur la gélose précédente.

Après deuxième séchage, les boîtes de Pétri sont incubées à 37°C pendant 24h. Les diamètres des zones d'inhibition sont mesurés au millimètre (*Prescot*, 1995 ; *Madigan et al.*, 1997).

6.5. Test de l'antagonisme

L'antagonisme se manifeste généralement soit par une compétition, un hyper parasitisme, une production de sidérophores ou une antibiose (*Soufiane*, 1998). Le choix d'un milieu de culture adéquat est indispensable au bon développement du pathogène et de l'antagoniste. Le milieu PDA (Annexe1) assure de bonnes conditions de cultures.

- L'activité antagoniste a été étudiée selon deux méthodes :
- Antagonisme en confrontation directe
- Antagonisme en confrontation indirecte

6.5.1. Antagonisme en confrontation directe

Les confrontations *in vitro* sont effectuées selon la méthode de *Patel et Brown* (1969).

Dans des boîtes de Pétri de 90 mm de diamètre, contenant 15 ml de milieu PDA (Annexe 1), deux disques gélosés, l'une portant l'agent antagoniste pure¹ et l'autre Agent antagoniste pure². Les deux disques sont placés suivant un axe diamétral à 5 cm et à équidistance du centre de la boîte. Les repiquages sont effectués, en même temps (Benhamou et Chet, 1996). L'incubation est réalisée à 30°C pendant sept jours. Des notations concernant l'inhibition de la croissance diamétrale des colonies de l'agent antagoniste **1** et leur envahissement par le mycélium de l'Agent antagoniste **2** sont effectuées chaque jour jusqu'à le septième jour.

7. Méthode de fermentation

La fermentation a été réalisée dans un milieu solide à base de déchets de tomate dans le but de doser l'activité protéolytique développée par la souche fongique testée.

7.1. Substrat de fermentation

Nous avons utilisé comme substrat de base du milieu de fermentation les déchets de tomates. Ces derniers sont à deux origines, une industriel obtenus de la conserverie « La Maison Latina » de Chelghoum Laid (wilaya de Mila) et l'autre sont de la maison. Les déchets sont séchés à l'air libre (25 – 30°C) pendant 3 - 4 jours.

7.2. Préparation du milieu de culture

Pour la réalisation des fermentations, cinq (05) grammes de déchets de tomates sont introduits dans un erlenmeyer de 250 ml, puis 10 ml d'agent humidifiant sont additionnés à ce substrat. Cette opération a été effectuée à raison de deux (02) erlenmeyers par concentration de NaCl (1g, 2g, 5g, et 10g), et pour les trois températures d'incubation (30°C, 37°C et 53°C).

L'ensemble de tous les erlenmeyers contenant les milieux de culture préparés a été bouché par du coton cardé et couvert par le papier aluminium. Ces erlenmeyers sont stérilisés dans l'autoclave à 121°C pendant 20 min.

7.3. Conduite de la fermentation

Après refroidissement des erlenmeyers, les milieux de culture sont inoculés par cinq disques de la culture de la souche étudiée, le contenu de chaque erlenmeyer doit être bien mélangé à l'aide d'une tige en verre stérile. L'ensemble des erlenmeyers est par la suite incubés dans l'étuve pendant une semaine pour les trois (03) températures étudiées : 30°C, 37°C et 53°C.

Après incubation, 50 ml de l'eau distillée sont ajoutés à chaque erlenmeyer. Le mélange est laissé s'homogénéiser dans un incubateur agitateur pendant 1 h à 180 rpm. Ensuite, le mélange est alors filtré à travers un tissu, le filtrat est lui-même clarifié par une autre filtration sur papier filtre (Whatman n°1). Le filtrat clair obtenu constitue l'extrait enzymatique brut ; il est conservé au congélateur pour les dosages ultérieurs.

A la fin de la fermentation, les paramètres du pH et activité protéolytique ont été estimés.

8. Dosage de l'activité protéolytique

L'activité de la protéase alcaline dans l'extrait enzymatique brut a été dosée par la méthode décrite par Lenoir et Auburger (1977) et modifiée par Mechakra et *al.* (1999).

8.1. Principe

Les protéases catalysent l'hydrolyse des protéines en libérant des peptides simples et des acides aminés libres qui se trouvent dans la phase soluble. Les molécules non hydrolysées sont précipitées par le TCA, ce qui permet de récupérer les fragments solubles dans le filtrat. La tyrosine est un acide aminé présent dans toutes les protéines, sa présence dans le filtrat est traduite en activité protéasique par un dosage colorimétrique à l'aide du réactif de *Folin-Ciocalteu*. Celui-ci réagit avec la tyrosine et le tryptophane pour donner par réduction un complexe bleu.

8.2. Réaction enzymatique

Le mélange réactionnel a été préparé par addition de :

- 1 ml d'extrait enzymatique décongelé juste avant le dosage
- 1.5 ml de tampon Tris-HCl (0.2M / 0.1 M), pH=8
- 2.5 ml de substrat (solution de caséine 2.5% dans le citrate de sodium à 0.02 M

Après agitation, ce mélange a été incubé dans un bain marie à 40°C pendant une demie heure, puis la réaction est arrêtée par addition de 5 ml de TCA froid (4%). Par la suite, il a été laissé

reposer 30 min dans un bain de glace (Beynon et Oliver, 2004 ; Wu et *al.*, 2006 ; Devi et *al.*, 2008) ; ce qui entraîne la précipitation des macromolécules, y compris l'enzyme et la caséine non hydrolysées (Sandhya et *al.*, 2005). Le mélange subit ensuite une filtration sur papier Whatman n°1.

Par ailleurs, les témoins ont été parallèlement préparés dans les mêmes conditions en dénaturant l'enzyme ; c'est-à-dire en ajoutant le TCA avant le substrat.

8.3. Protocole de dosage

Les composés azotés non protéiques solubles dans le filtrat sont dosés par la méthode d'*Anson* (1938). A cet effet, 0.5 ml du filtrat ont été mélangés avec 2.5 ml de Na_2CO_3 à 2% dans le NaOH (0.1N). Après agitation et incubation 10 min à température ambiante, 0.25 ml de réactif de *Folin-Ciocalteu* dilué au 1/4ème ont été ajoutés. Les mélanges ont été bien agités et laissés reposer à 30°C et à l'obscurité pendant au moins 30 min (Paranthaman et *al.*, 2009).

L'absorbance de la coloration bleue développée a été lue à 750 nm dans un spectrophotomètre (SHIMADZU UV-1280). Chaque dosage a été effectué en deux (02) répétitions.

1. Echantillonnage

Les caractéristiques des échantillons prélevés de la région de Biskra sont consignées dans le tableau (9) :

Tableau 9 : Caractéristiques des échantillons.

Echantillon	Date	Site de prélèvement	Description	pH
1	16/02/2019	Sol du lac principal (profondeur 20 Cm)	Zone très exposée, ensoleillée, aspect boueux, couleur marron foncée (25°Bowie)	6.70
2	16/02/2019	Sol des palmeraies (profondeur 50 Cm)	Zone peu exposée, ombrée, présence de végétation, taux de salinité élevée (25°Bowie)	7.60

Les échantillons prélevés ont un pH neutre qui varie de 6.70 à 7.60 compatible avec celui des milieux naturels salés. Par ailleurs, il est intéressant de noter que, l'ensemble des échantillons examinés appartient à un écosystème extrêmes (végétation très réduite, salinité très élevée de plus de 25° Bowie, température élevée pouvant atteindre 49.5°C, pluviométrie : 120 à 150 mm/an correspondant à 15 jours de pluie par an).

2. Résultats d'isolement

Sur les deux échantillons prélevés, nous avons isolé 26 souches fongiques (A, A₁, A₂, A₃, B₁, B₂, B₃, C₁, C₂, D₁, D₂, D₃, E₁, E₂, E₃, E₄, F, G₁, G₂, G₃, H₁, H₂, I₁, I₂, I₃, K) réparties en fonction des sites d'échantillonnage et des milieux d'isolement (PDA, Czapeck Dox et Czapeck Dox NaCl 5%) (Tableau 10).

Tableau 10 : Le nombre des souches fongiques poussées sur les trois milieux de culture.

Origine	Milieu	Technique d'ensemencement	Dilution	Nombre de colonies
Site 01	PDA	En masse	10 ⁻¹	1 (A)
		En surface	10 ⁻³	3 (A ₁ , A ₂ , A ₃)
			10 ⁻⁵	3(B ₁ , B ₂ , B ₃)
	Czapeck Dox	En masse	10 ⁻⁴	2(C ₁ , C ₂)
		En surface	10 ⁻²	3 (D ₁ , D ₂ , D ₃)
Site 02		En masse	10 ⁻¹	4 (E ₁ , E ₂ , E ₃ , E ₄)
			10 ⁻⁵	1(F)
		En surface	10 ⁻¹	3(G ₁ , G ₂ , G ₃)
			10 ⁻³	2(H ₁ , H ₂)
Site 01	Czapeck Dox NaCl 5%	En surface	10 ⁻¹	3(I ₁ , I ₂ , I ₃)
		En masse	10 ⁻¹	1(K)

Nous observons une densité de souches fongiques dans le sol des palmeraies. A l'inverse, l'autre échantillon représenté par le sol du lac renferme beaucoup moins de souches fongiques (tableau 10).

Ce résultat s'explique probablement par la richesse du sol de palmeraies (Site 01) en matière organique (Gunde-Cimerman et *al.*, 2005), apportée par les fruits et les feuilles, forme végétative du palmier dattier et d'autres plantes, ainsi que par le caractère halophile des souches isolées. De l'autre côté, la densité de souche fongique diminue dans le sol de lac (Site 02). Ce résultat s'explique probablement par le taux relativement élevé de la matière organique décrit par Gunde-Cimerman et *al.* (2005) qui ont mentionné que le nombre de moisissures halophiles du sol est proportionnel à sa quantité en matière organique.

Le tableau 10 montre une différence du nombre des souches obtenues en fonction de la méthode d'ensemencement (en masse ou en surface), notez que le nombre des souches obtenues par la méthode d'ensemencement en surface est plus élevé que celui par la méthode en masse.

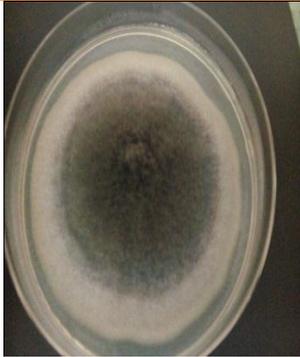
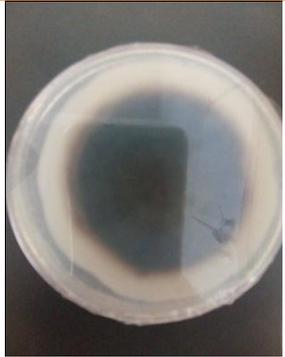
3. Résultats de l'identification

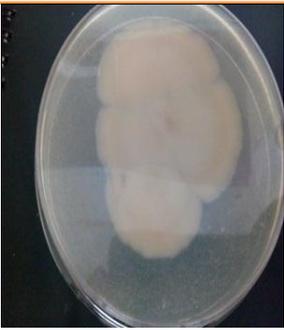
L'identification des isolats fongiques sélectionnés étant basée essentiellement sur les clés de détermination décrites par la littérature (Botton et *al.*, 1990 ; Guiraud, 1998) en se basant sur les caractères macroscopiques des colonies (aspect, couleur, forme, contour, etc.) et sur les caractères microscopiques du mycélium et des conidies ou spores (cloisonnement du mycélium, forme des spores, forme des organes de fructification, etc.).

a. Identification macroscopique

Les caractères macroscopiques des différents isolats fongiques obtenus ont été étudiés après culture sur le milieu PDA, le plus communément utilisé à cet effet (Botton et *al.*, 1990). Le Tableau 11 résume l'aspect du mycélium des isolats obtenus, On y retrouve la forme, la couleur, le contour, la texture des colonies ainsi que la couleur du revers de ces dernières.

Tableau 11 : Etude macroscopique des isolats fongiques cultivés sur milieu PDA.

Code de la souche	Origine de la souche	Description	Aspect macroscopique	
			Face	Revers
A <i>Altarnaria</i>	Site 01	<p>Croissance : rapide</p> <p>Forme : ronde</p> <p>Couleur : brune virant au noire</p> <p>Texture : duveteuse</p> <p>Revers : noire, contour blanc</p>		
A ₁ , A ₂ , A ₃ <i>Trichoderma</i>	Site01	<p>Croissance : très rapide</p> <p>Forme : envahissante</p> <p>Couleur : vert foncé</p> <p>Texture : granuleuse</p> <p>Revers : jaune vert</p>		
C ₁ , C ₂ , D ₁ , D ₂ , D ₃ , E ₁ , E ₂ , E ₃ , E ₄ , F, H ₁ , H ₂ <i>Aspergillus</i>	Site 01 et Site 02	<p>Croissance : rapide</p> <p>Forme : irrégulière</p> <p>Couleur : blanchâtre, centre jaune</p> <p>Texture : cotonneuse</p> <p>Revers : jaune</p>		

<p>B₁</p> <p><i>Penicillium</i></p>	<p>Site 01</p>	<p>Croissance : rapide</p> <p>Forme : envahissante</p> <p>Couleur : vert foncé</p> <p>Texture : poudreuse</p> <p>Revers : vert</p>		
<p>B₂,B₃</p> <p><i>Aspergillus</i></p>	<p>Site 01</p>	<p>Croissance : lente</p> <p>Forme : ovoïde</p> <p>Couleur : blanchâtre</p> <p>Texture : veloutée</p> <p>Revers : beige</p>		
<p>K</p> <p><i>Aspergillus</i></p>	<p>Site 01</p>	<p>Croissance : rapide</p> <p>Forme : envahissante</p> <p>Couleur : marron clair, contour blanc</p> <p>Revers : beige, centre marron</p> <p>Texture : laineuse</p>		

I₁, I₂, I₃ <i>Trichoderma</i>	Site 01	Croissance : très rapide Forme : envahissante Couleur : vert Texture : poudreuse Revers : beige virant au jaune		
--	---------	---	--	---

b. Identification microscopique

L'étude microscopique porte sur l'observation des structures morphologiques caractéristiques des souches fongiques isolées (mycélium, conidiophore, conidiospores, etc.). Sur la base de cette identification microscopique, 04 genres de moisissures ont été mises en évidence sur le tableau 12.

Une souche (A) présente les caractères suivants :

- Conidiophores cloisonné longitudinalement et transversalement, brune
- Conidies bourgeonnées, en chaînes acropétales, brune, pluricellulaire, d'aspect piriforme ou ovoïde, cloisonnées longitudinalement et transversalement.

Ces souches appartiennent probablement au genre *Alternaria*.

Douze souches (B₂, B₃, C₁, C₂, D₁, D₂, D₃, E₁, E₂, E₃, E₄, F, H₁, H₂, K) caractérisées par :

- mycélium cloisonné.
- Des conidiophores nombreux.
- Des vésicules formées à l'extrémité de conidiophore.
- Des phialides formés directement sur la vésicule.
- Des cellules à paroi épaisse.

Ces souches semblent appartenir au genre *Aspergillus*.

Deux souches (A1, A2, A3, I1, I2, I3) caractérisées par :

- Conidiophores en touffes compactes, très ramifiés, irrégulièrement verticillés avec des ramifications à angle droit
- Phialides ovoïdes à ellipsoïdales, atténuées au sommet
- Conidies réunies en glomérules au sommet des phialides.

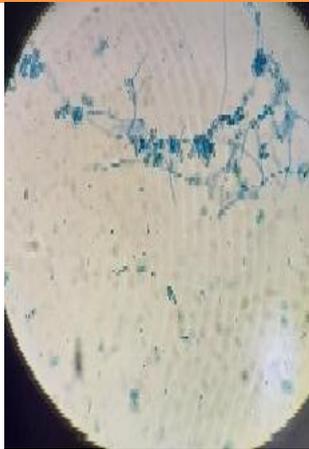
Ces critères rejoignent ceux du genre *Trichoderma*.

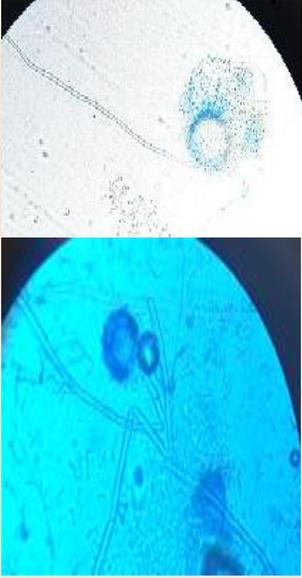
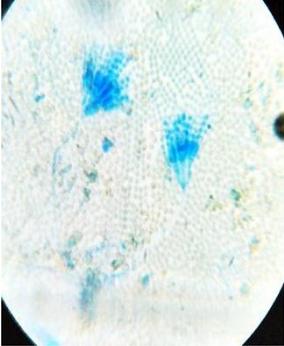
1souche (B1) caractérisée par :

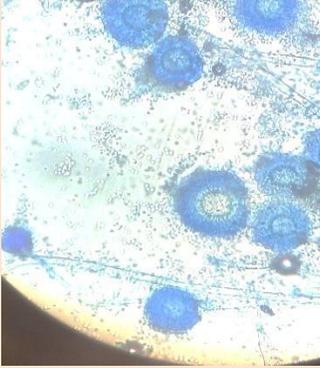
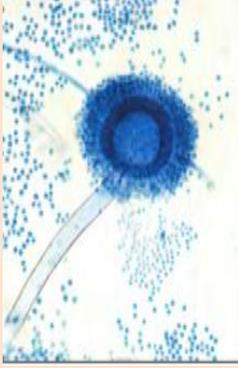
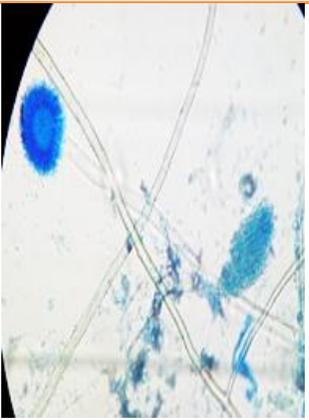
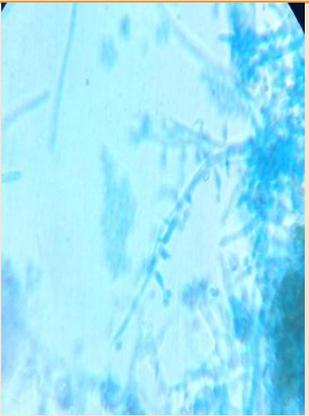
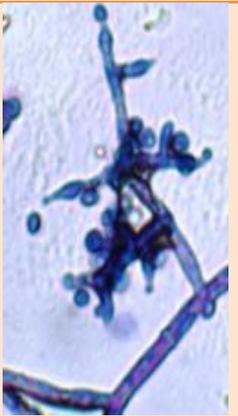
- Des conidiophores isolés.
- Des pénicilles constitués de phialides branchés directement à l'extrémité du conidiophore.
- Des Conidies de forme ovoïde.

Ces souches appartiennent probablement au genre *Penicillium*.

Tableau 12 : Caractères microscopiques des souches sélectionnées

Code de la souche	Origine de la souche	Description	Aspect microscopique obtenu de (nos résultats)	Photos microscopiques référence (Malloch, 1997 ; Chabasse et al., 2002).
A <i>Alternaria sp.</i>	Site 01	<p>-Hyphes septés</p> <p>Conidiophores cloisonnés longitudinalement et transversalement, bruns, simple</p> <p>-conidies brunes, pluricellulaire, d'aspect piriforme ou ovoïde</p>		
A ₁ , A ₂ , A ₃ <i>Trichoderma sp. 1</i>	Site01	<p>- Hyphes septés à croissance rapide.</p> <p>-Conidiophores en touffes compactes, très ramifiés, irrégulièrement verticillés avec des ramifications à angle droit.</p> <p>-Phialides ovoïdes à ellipsoïdales, atténuées au sommet.</p> <p>-Conidies réunies en glomérules au sommet des phialides.</p>		

<p>C₁,C₂,D₁,D₂,D₃,E₁, E₂,E₃,E₄, F,H₁,H₂ <i>Aspergillus niger</i></p>	<p>Site 01 et Site 02</p>	<p>-Hyphes septés. -Têtes conidiennes bisériées, radiées. - Conidiophores lisses, hyalins. -Vésicules globuleuses. -Métules brunâtres, variables. -Conidies globuleuses, échinulées.</p>		
<p>B₁ <i>Penicillium sp.</i></p>	<p>Site 01</p>	<p>-Hyphes septés. -Conidiophores isolés, simples ou ramifiés, terminés par un pénicille. -Pénicilles constitués de phialides branchés directement à l'extrémité du conidiophore. -Conidies disposées en longue chaîne, globuleuses, cylindriques ou fusiformes, lisses ou rugueuses.</p>		

<p>B₂</p> <p><i>Aspergillus flavus</i></p>	<p>Site 01</p>	<p>-Hyphes septés.</p> <p>-Têtes conidiennes unisériées ou bisériées.</p> <p>-Conidiophores hyalins.</p> <p>-Vésicules subglobuleuses.</p> <p>-Conidies globuleuses à subglobuleuses.</p>		
<p>K</p> <p><i>Aspergillus fumigatus</i></p>	<p>Site 01</p>	<p>-Hyphes septés.</p> <p>-Têtes conidiennes unisériées, en colonne compacte.</p> <p>-Conidiophores courts s'élargissant au sommet en vésicule subhémisphérique</p> <p>-Phialides dressés groupées.</p> <p>-Conidies sub-globuleuses à globuleuses, échinulées.</p>		
<p>I₁, I₂, I₃</p> <p><i>Trichoderma sp. 2</i></p>	<p>Site 01</p>	<p>-Hyphes septés.</p> <p>- Conidiophores en touffe compacte, très ramifiés, irrégulièrement verticillés.</p> <p>- Phialides ovoïdes et ellipsoïdales atténués au sommet, avec Conidies réunies en glomérules.</p>		

Les caractères des 4 genres cités précédemment correspondent parfaitement à ceux décrits par Larone(1995) ; St-Germain et ses collaborateurs (1996) ; Collier et son équipe (1998) pour l'identification du genre *Aspergillus*, ou encore par Larone (1995) ; St-Germain et ses collaborateurs(1996) ; Malloch, (1997) ; Sutton et ses collaborateurs(1998) ; De Hoog et son équipe(2000) pour celle du genre *Penicillium*.

Aussi, le genre *Alternaria* qui est décrit par Samson et son équipe(1981) ; Guiraud (1998) et Botton et *al.* (1990).

Après la purification, nous avons obtenu 7 isolats fongiques représentant 4 genres : *Alternaria*, *Aspergillus*, *Penicillium* et *Trichoderma*.

Le genre majoritaire est *Aspergillus* avec une fréquence de 43% regroupant 3 espèces *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, suivie par le genre *Trichoderma* avec un pourcentage de 29% (*Trichoderma sp.1*, et *Trichoderma sp.2*), puis les genres : *Penicillium* 14 % (*Penicillium sp.*), et enfin le genre *Alternaria* qui représente un pourcentage de 14% (*Alternaria sp.*)(Figure 7).

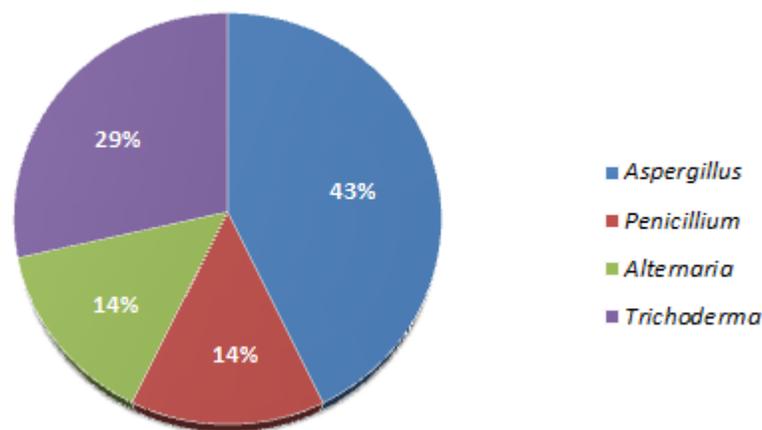


Figure 7: Pourcentage de la mycoflore isolée des deux échantillons du sol.

Nos résultats sont en accord avec (Hasenekoglu et Azaz, 1991) qu'ils ont isolées 127 souches à partir de 50 échantillons de sol. L'identification de ces isolats donne lieu à une 12espèces. Les plus riches genres en termes de nombre des espèces sont *Penicillium*, *Acremonium*, *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Cladosporium* et *Mortierella*.

4. Résultats des tests d'activité enzymatique

Tous les isolats sont testés pour diverses activités enzymatiques, amylase, protéase, gélatinase et cellulase.

4.1. Dégradation d'amylase

L'activité amylolytique se traduit par la présence d'un halo clair autour de la colonie après l'addition du «Lugol » (figure 8).

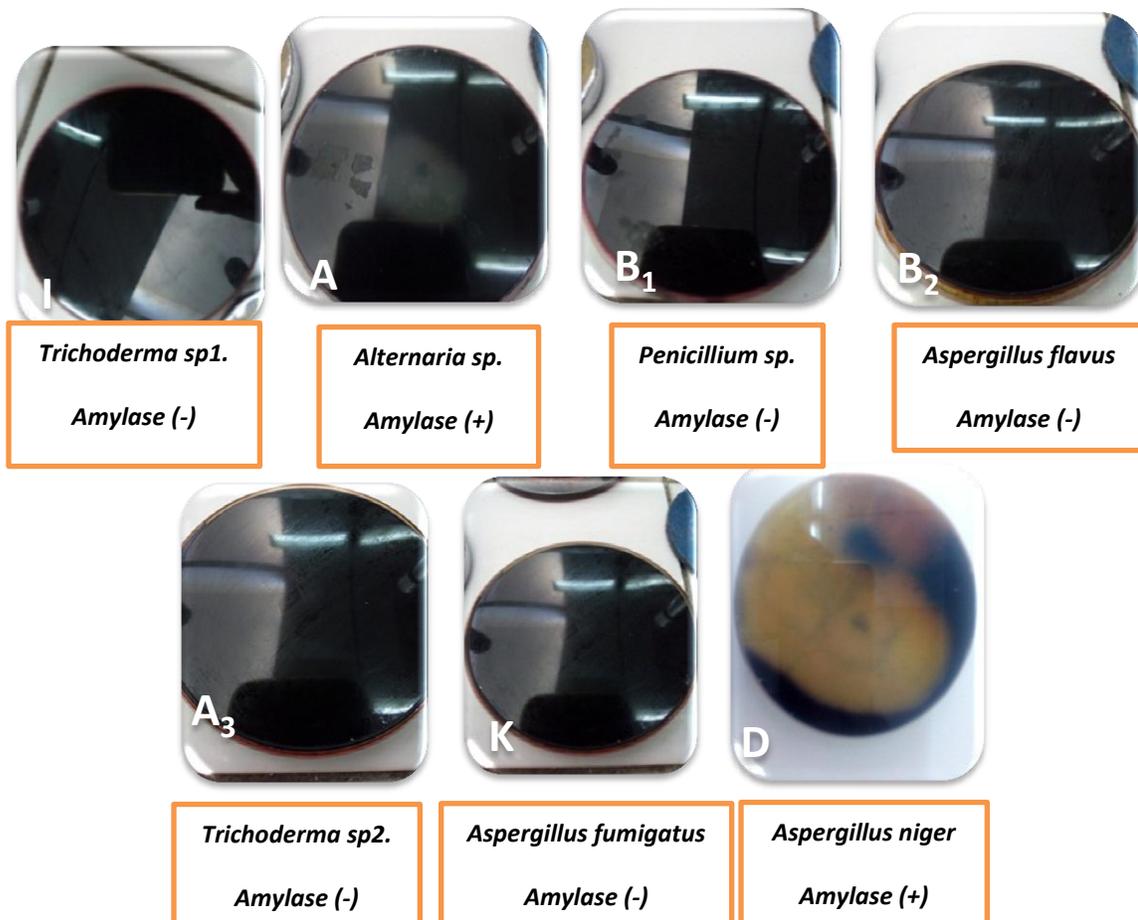


Figure 8 : Photos représentant les résultats de l'activité amylolytique.

D'après la figure ci-dessus, on remarque que toutes les souches testées n'ont pas pu dégrader l'amidon à l'exception de deux souches *Alternaria sp.* (A) et *Aspergillus niger* (D).

Les amylases sont des enzymes qui hydrolysent l'amidon ou le glycogène. Elles peuvent dériver de plusieurs sources comme les plantes, les animaux et les microorganismes. Ces derniers sont plus favorisés grâce à leur large disponibilité et leur production volumineuse à l'échelle industrielle (Vidyalakshmi et *al.*, 2009).

La production industrielle d'enzymes à partir des microorganismes fongiques appartenant surtout aux genres *Aspergillus* et *Penicillium*, existe depuis longtemps, du fait que la première production d' α -amylase a été réussie par Takamine en 1894. Actuellement d'autres genres de moisissures dont *Rhizopus* et *Alternaria* ont été utilisés pour la production d' α -amylase relativement thermostable (Lateef et *al.*, 2004 ; Ait Kaki et *al.*, 2012).

4.2. Dégradation des protéines

4.2.1 .Dégradation de la caséine

La dégradation de la caséine se traduit par l'apparition d'un halo clair autour de la colonie (Figure 9).

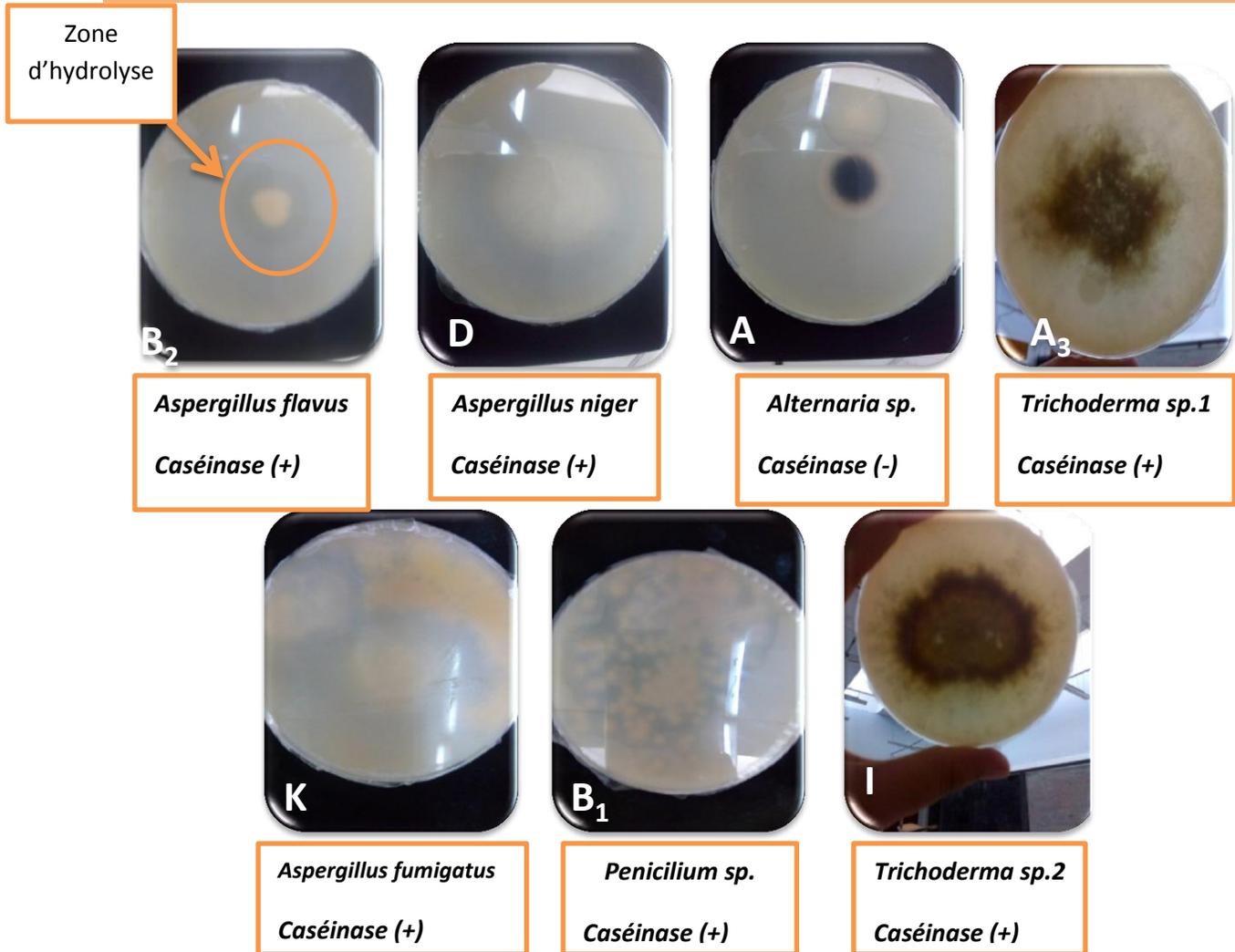


Figure 9 : Photos représentant le résultat de l'activité de la caséinase.

Les tests de protéolyse sont réalisés sur le lait gélosé à 20% ; ils ont permis la mise en évidence de l'activité protéolytique chez les sept souches. Parmi lesquelles, six ont donné des résultats positifs et sont caractérisées par des zones d'hydrolyse dont le diamètre varie de 13 à 26mm (Figure 9). Les mesures sont effectuées à partir du quatrième jour jusqu'au sixième. L'envahissement de ce milieu par la majorité des moisissures étudiées a limité les mesures à six jours d'incubation. (Tableau 13).

Ces résultats permettent de considérer ces souches comme des moisissures productrices de protéases exocellulaires (Smith et *al.*, 1952 ; Duce et Thomas, 1959). Parmi ces souches nous avons sélectionné une, qui a le diamètre le plus grand (26mm) pour la fermentation.

Il est à noter que même en absence d'une activité protéolytique exocellulaire, on observe un envahissement du milieu par les moisissures. Ceci indique une utilisation du sucre lactose présent dans le lait comme source de carbone et d'énergie ou par la production d'une activité protéolytique endocellulaire (Dendouga, 2006).

Tableau 13 : Mise en évidence de l'activité protéolytique exocellulaire sur le lait gélosé à 20%.

Espèces	Diamètre de la colonie (mm)			Diamètre de la zone d'hydrolyse (mm)		
	4 ^{eme}	5 ^{eme}	6 ^{eme}	4 ^{eme}	5 ^{eme}	6 ^{eme}
<i>Aspergillus flavus</i> <i>B₂</i>	14	15	15	14	24	*
<i>Aspergillus niger</i> <i>D</i>	42	50	*	15	26	*
<i>Aspergillus fumigatus</i> <i>K</i>	26	26	27	10	13	23
<i>Penicillium sp.</i> <i>B₁</i>	09	09	*	11	17	*
<i>Trichoderma sp.1</i> <i>A₃</i>	47	*	*	18	*	*
<i>Trichoderma sp.2</i> <i>I₂</i>	55	*	*	20	*	*
<i>Alternaria sp.</i> <i>A</i>	29	30	30	0	0	0

* : envahissement du milieu par les moisissures.

4.2.2. Dégradation de la gélatine

Parmi les sept isolats fongiques testés, cinq ont pu produire l'enzyme gélatinase (*Aspergillus flavus* ; *Aspergillus fumigatus* ; *Penicillium sp.*; *Trichoderma sp.1* et *Trichoderma sp.2*).

Cette activité se traduit par l'apparition d'une auréole claire entourant la colonie après l'ajout d'une solution de chlorure de mercure (figure 10).

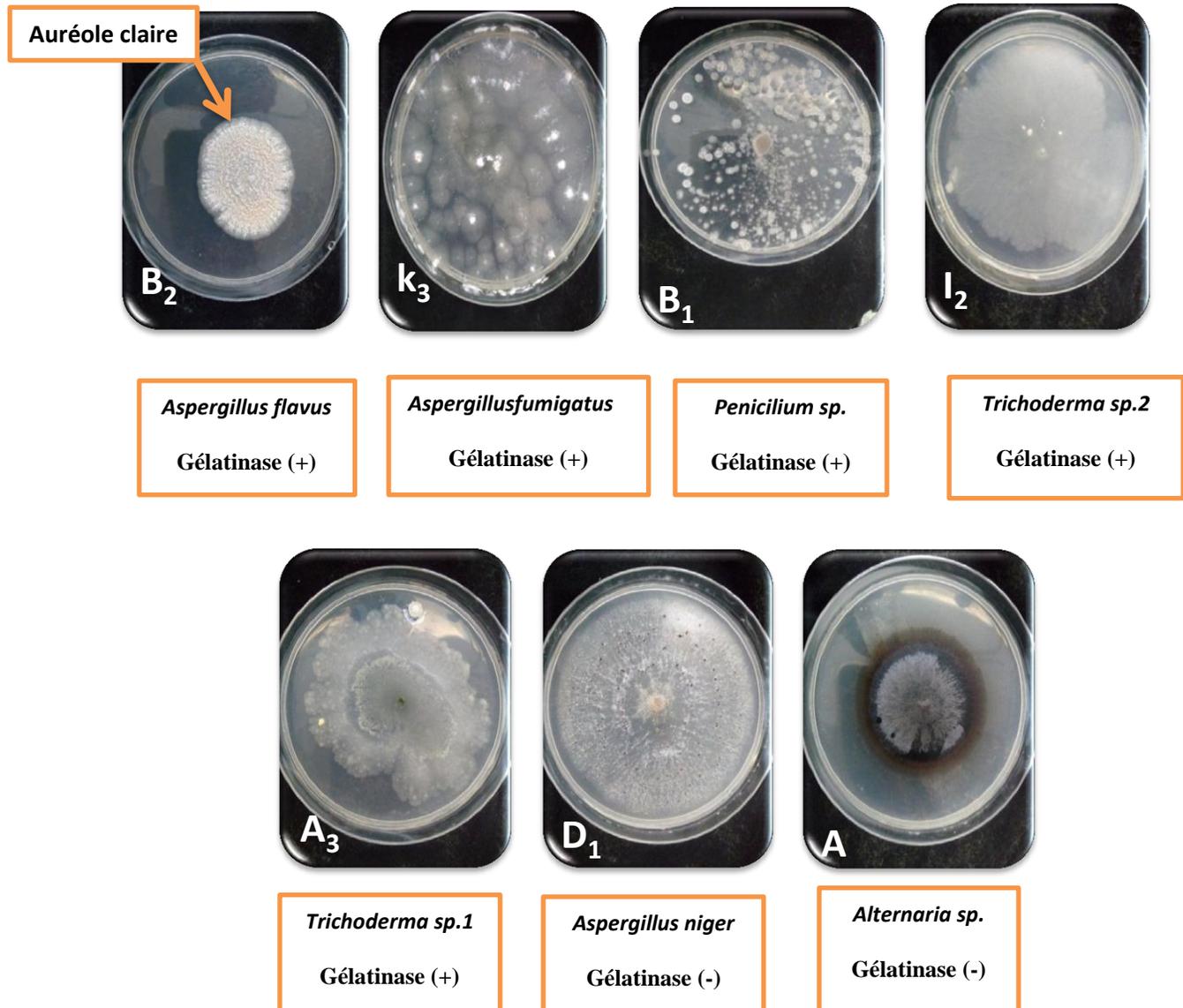


Figure 10: Photos représentant les résultats de l'activité de la gélatinase.

La dégradation des protéines par les protéases microbiennes est importante dans le cycle d'azote au niveau du sol, en le rendant disponible pour les plantes et les micro-organismes. Les protéases d'origine microbienne sont probablement les plus secrétées parmi toutes les enzymes (Ningthoujam et al., 2009).

Les protéases sont les enzymes les plus importantes en industrie avec 60% du total des enzymes vendues. Elles sont utilisées dans le domaine alimentaire, l'industrie fromagère, les détergents, l'industrie de soie, domaine de la pharmacologie et la production de médicaments et dans l'agriculture (Petit et Jobin, 2005).

4.3. Dégradation de la cellulose

Cette activité se traduit par l'apparition d'un halo jaune orangé entourant la colonie après l'ajout du « *Rouge Congo* à 1% ».

Parmi les sept souches testées, aucune souche n'a pu dégrader la cellulose.

En revanche, dans la bibliographie le genre *Trichoderma* est connu parmi les souches fongiques les plus cellulolytiques (Petersson et al., 1981 ; Kubicek., 1998), par leur capacité à produire le complexe cellulolytique composé d'au moins 2 exoglucanases (Shoemaker et al., 1983 ; Chen et al., 1987), 5 endoglucanases (Pentilla et al., 1987) et 2 β -glucosidases (Barnett et al., 1991 ; Takashima et al., 1999 ; Nogawa et al., 2001). Aussi, les 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 Montencourt, 1984, Kubicek et Penttilä, 1998 ; Takashima et al., 1999 ; Nogawa et al., 2001). Nos résultats sont en désaccord avec la bibliographie, Cela pourrait s'expliquer par une erreur dans le milieu de culture.

L'observation au microscope électronique permet de distinguer une association des chaînes de cellulose par des liaisons hydrogènes intra et inter moléculaires, formant des microfibrilles rigides et insolubles (Hasper et al., 2002). C'est pour cette raison que on n'a pas pu observer un développement des mycéliums sur les boîtes jusqu'à environ un mois.

Par conséquent, on ne peut pas dire que nos souches testées ne sont pas productrices de cellulase. La raison pour laquelle on n'a pas pu observer le halo revient probablement à la faible concentration de la cellulose dans le milieu test ; sinon on doit changer le substrat cellulose pur par le CMC (Carboxyméthylcellulose) (Meziani et Mahcene, 2017) et encore faire le test sur milieu liquide minéral contenant une bandelette du papier filtre (Bensmira, 2006).

La dégradation de la cellulose joue un rôle clé dans le cycle de carbone (Lee et *al.*, 2007), elle est essentiellement convertie par les microorganismes en dioxyde de carbone dans des conditions aérobies et en méthane en anaérobiose (Eriksson, 1985). Les cellulases étaient commercialement valables pour plus de 30ans, et présentaient une cible pour les recherches académiques comme celles industrielles (Singh, et *al.*, 1999). Son utilisation permet potentiellement la production de glucose, élément de base, qui une fois fermentée permet d'accéder à d'autres substances clés à savoir alcools, acétones et acides organiques notamment des gras volatiles d'où l'importance, écologique et industrielle, considérable des cellulases (Receveur et *al.*, 2002) ce qui revoie à différentes applications industrielles.

Les résultats des activités enzymatiques des 07 souches étudiées sont illustrés dans le tableau ci-dessous (Tableau 14).

Tableau 14 : Résultats des activités enzymatiques des 07 souches étudiées.

L'enzyme testée Isolat	Amylase	Protéase	Gélatinase	Cellulase
A <i>Alternaria sp.</i>	+	-	-	-
A ₃ <i>Trichoderma sp.1</i>	-	+	+	-
B ₁ <i>Penicillium sp.</i>	-	+	+	-
B ₂ <i>Aspergillus flavus</i>	-	+	+	-
D <i>Aspergillus niger</i>	+	+	-	-
K <i>Aspergillus fumigatus</i>	-	+	+	-
I <i>Trichoderma sp.2</i>	-	+	+	-

+ : Résultat positif

- : Résultat négatif

Le tableau indique que toutes les souches étudiées ont montré au moins une activité enzymatique parmi les 4 différentes activités testées.

En fait, les données littéraires ont rapporté que les moisissures sont capables de produire un grand nombre d'enzymes, qui sont d'une valeur commerciale élevée (Zhou et *al.*, 2000 ; Chakraborty et *al.*, 2009 ; Avramenko et Galynkin, 2010). Ce résultat justifie aussi l'intérêt que portent les chercheurs sur ce type de microorganismes, un intérêt qui n'a cessé de s'accroître au cours de ces dernières années, principalement en raison du grand nombre d'applications que les enzymes offrent dans des domaines très variés (Keyhani et Roseman, 1999 ; Bhat, 2000 ; Mobini-Dehkordi et Javan, 2012).

5. Résultats du test de l'activité antibactérienne

Dans cette étude nous avons testé l'activité antibactérienne d'un total de 7 souches appartenant aux genres *Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria* et *Trichoderma* vis-à-vis de la bactérie (*Escherichia coli*).

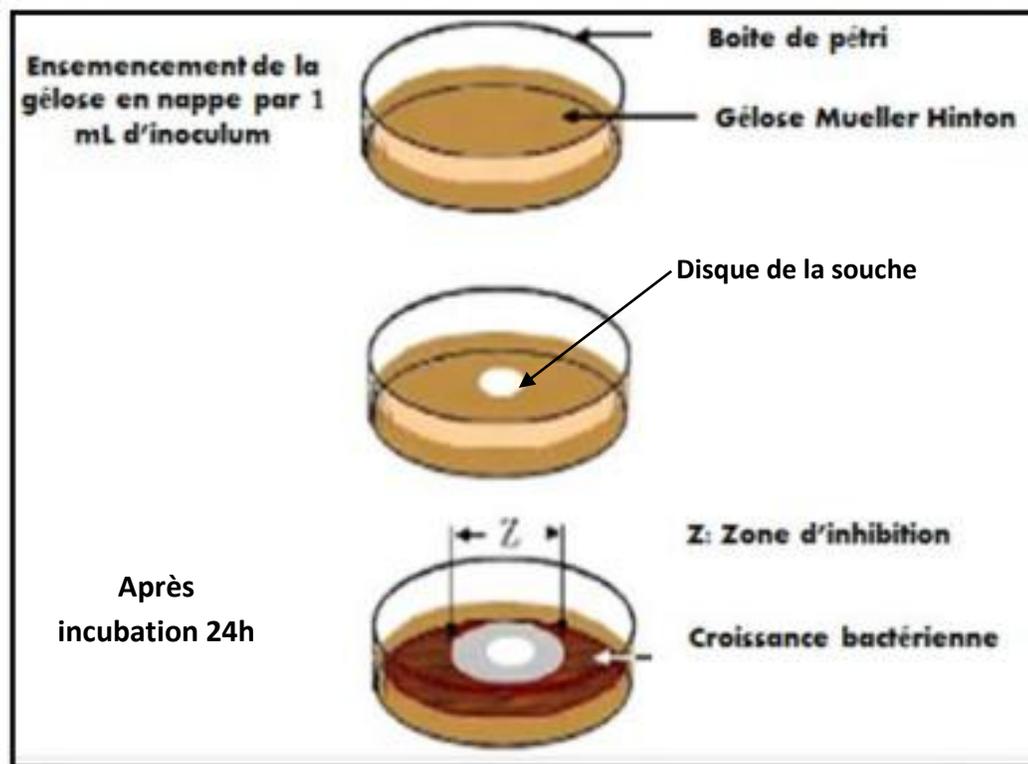


Figure 11 : Résultats attendus après réalisation des tests de l'activité antibactérienne.

L'activité antibactérienne se traduit par l'apparition d'un halo clair entourant le disque de la souche après 24h d'incubation à 37°C (Figure 11)

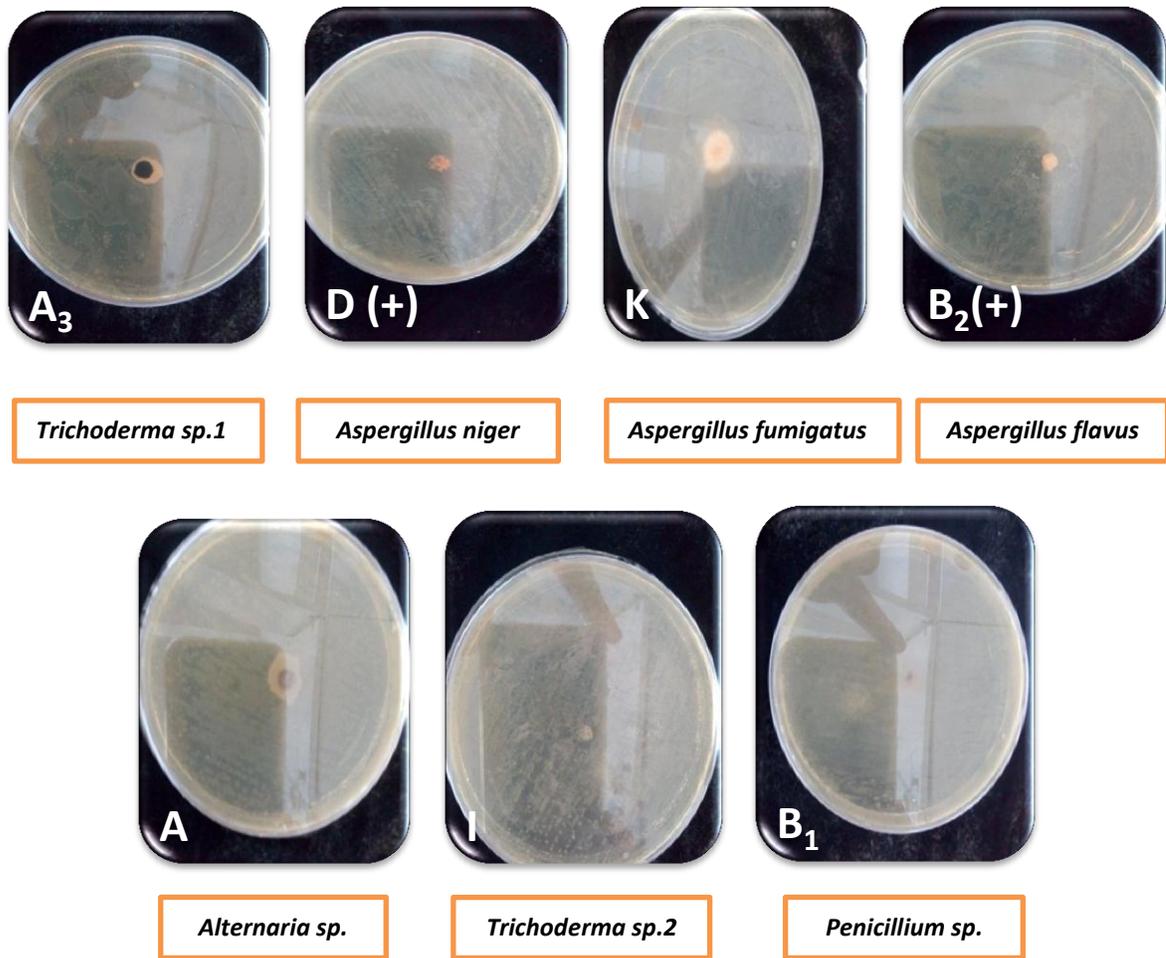


Figure 12 : Résultats du test de l'activité antibactérienne

La lecture des résultats (Figure 12) se fait par la mesure des diamètres de la zone d'inhibition autour de chaque disque (Tableau 15).

Tableau 15 : Diamètre de la zone d'inhibition développée par l'ensemble des isolats sur la bactérie test.

Les isolats	Diamètre de la zone d'inhibition Ø (mm) sur la bactérie test		
	1jour	2jour	3jour
<i>Aspergillus flavus</i> (B ₂)	10	10	10
<i>Penicilium sp.</i> (B ₁)	0	0	0
<i>Alternaria sp.</i> (A)	0	0	0
<i>Trichoderma sp.1</i> (A ₃)	0	0	0
<i>Aspergillus niger</i> (D ₁)	28	28	29
<i>Asperglus fumigatus</i> (K)	0	0	0
<i>Trichoderma sp.2</i> (I)	0	0	0

Parmi les 7 espèces de moisissures testées, seulement 2 ont montré un effet antibactérien vis-à-vis la bactérie *E.coli*, à savoir : une espèce à fort effet antibactérien *Aspergillus niger* (D₁), avec une zone d'inhibition égale à 29 mm et une autre *Aspergillus flavus*(B₂) à moyen effet antibactérien, avec une zone d'inhibition égale à 10mm.

L'effet antibactérien de ces souches d'*Aspergillus*, et donc, largement justifie d'autant plus, en parallèle avec les recherches bibliographiques, ainsi que, les genres d'*Aspergillus*, et les espèces de l'ordre des *Monilliales* qui constituent les réservoirs les plus important des antibiotiques (Botton et al., 1990). Ces métabolites secondaires biologiquement actifs, sont synthétisés en fin de croissances et ils sont de structures chimiques différentes de celle des protéines (Attalah et Kacem-chaouche, 1992).

6. Résultats des tests d'antagonisme

La lutte biologique contre les souches fongiques, fait largement appel à l'utilisation de test d'antagonisme. L'efficacité de la lutte dépend du choix de souches antagonistes performants à partir de critères impliquant une bonne connaissance de particularités biologiques du matériel fongique utilisé.

Les résultats de la confrontation directe entre les souches fongiques sont représentés dans les photos suivantes :

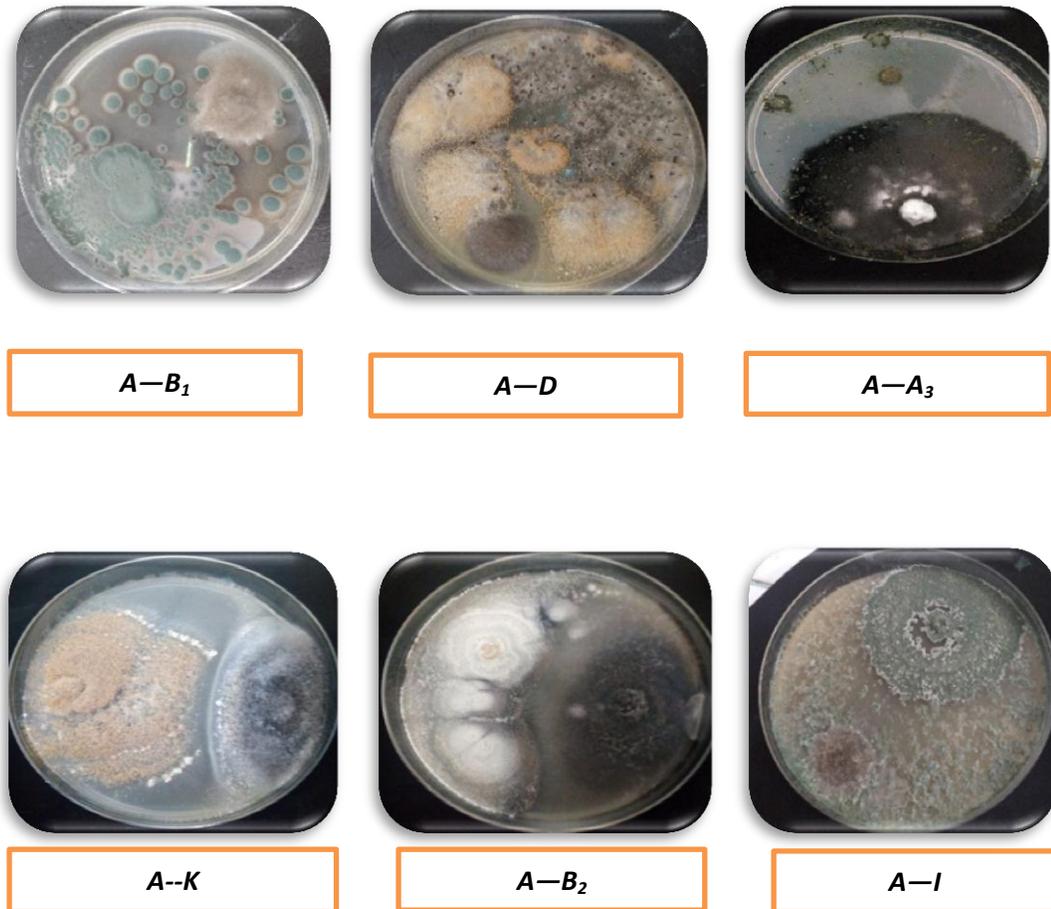


Figure 13 : *Alternaria sp.* (A) vis-à-vis *Aspergillus niger*(D) ; *Penicillium sp.* (B₁); *Trichoderma sp.1* (A₃) *Aspergillus flavus*(B₂) ; *Trichoderma sp.2*(I) ; *Aspergillus fumigatus*(K).

Le repiquage simultané d'*Alternaria sp.* (A) vis-à-vis *Aspergillus flavus*(B₂) ; *Aspergillus niger*(D) ; *Penicillium sp.* (B₁) ; *Trichoderma sp.1* (A₃) ; *Aspergillus fumigatus*(K) ; *Trichoderma sp.2*(I), a montré une croissance très lente par rapport au *Trichoderma sp.2*(I) ; *Aspergillus niger*(D) ; *Penicillium sp.* (B₁) Et une croissance remarquable contre *Aspergillus flavus*(B₂) ; *Trichoderma sp.1*(A₃) ; *Aspergillus fumigatus*(K) (Figure 13).

Donc : *Alternaria sp.* a un effet négligeable à l'égard des souches fongiques (*Aspergillus niger*(D) ; *Penicillium sp.* (B₁); *Trichoderma sp.1* (A₃); *Aspergillus flavus*(B₂); *Trichoderma sp.2* (I);*Aspergillus fumigatus*(K).

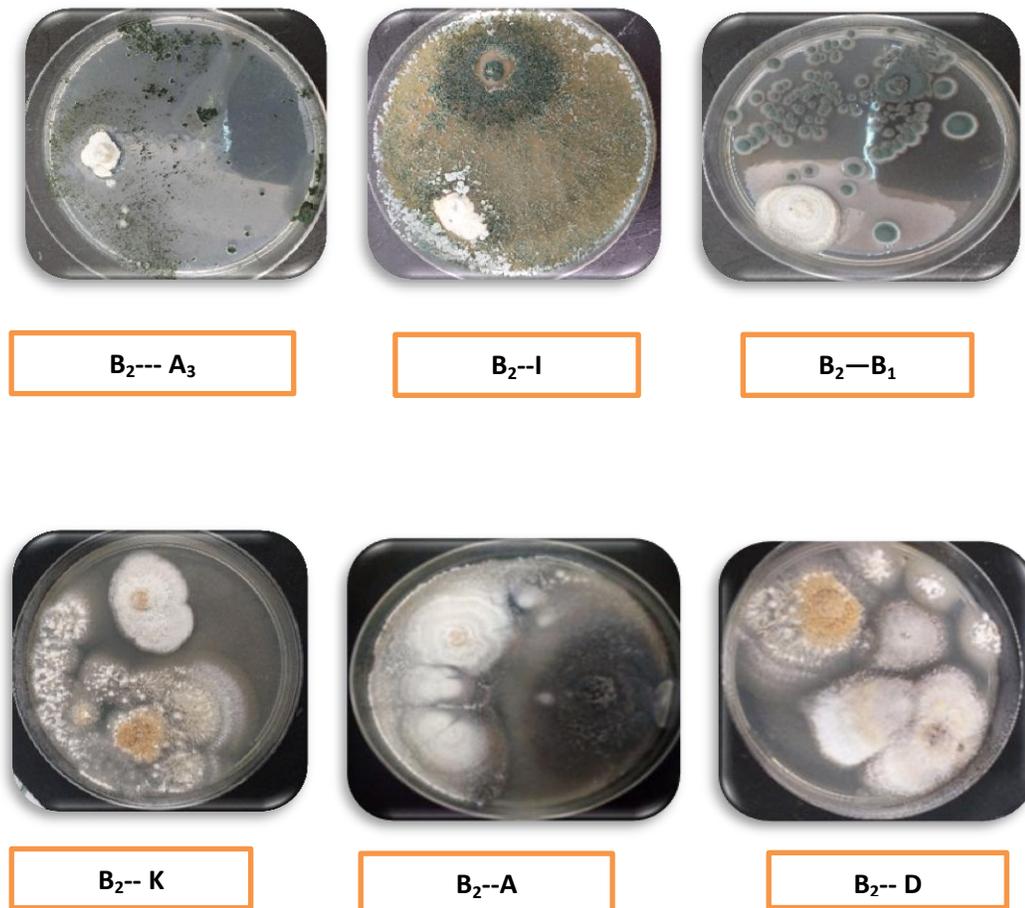


Figure 14: *Aspergillus flavus* (B₂) vis-à-vis *Alternaria sp.*(A)*Aspergillus fumigatus* (K); *Penicillium sp.*(B₁); *Trichoderma sp.1* (A₃); *Aspergillus niger* (D); *Trichoderma sp.2*(I).

Le repiquage simultané de *Aspergillus flavus*(B₂) vis-à-vis *Alternaria sp.* (A) *Aspergillus fumigatus* (K) ; *Penicillium sp.* (B₁); *Trichoderma sp.1* (A₃); *Aspergillus niger*(D); *Trichoderma sp.2*(I), à montre une croissance très lente par rapport au *Trichoderma sp.1*(A₃);*Trichoderma sp.2*(I);*Aspergillus niger*(D); *Penicillium sp.*(B₁) et *Aspergillus fumigatus*(K). Et une croissance remarquable contre *Alternaria sp.* (A) (Figure 14).

Donc : *Aspergillus flavus*(B_2) a un effet négligeable à l'égard des souches fongiques (*Aspergillus niger*(D) ; *Penicillium sp.* (B_1); *Trichoderma sp.1* (A_3) *Aspergillus niger*(D) ;*Trichoderma sp.2*(I) ;*Aspergillus fumigatus*(K).

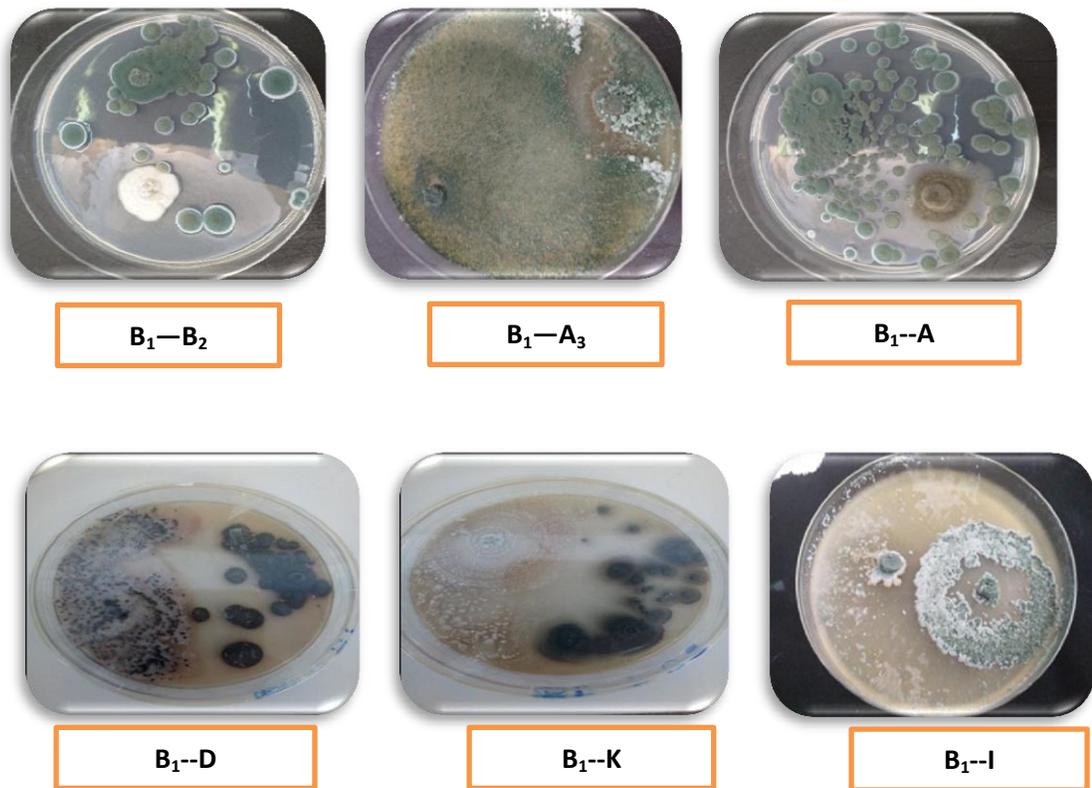


Figure 15 : *Penicillium sp.* (B_1) vis-à-vis *Aspergillus niger*(D) ; *Alternaria sp.* (A);*Aspergillus flavus*(B_2) ; *Trichoderma sp.1*(A_3) ; *Aspergillus fumigatus*(K) ; *Trichoderma sp.2* (I).

Le repiquage simultané de *Penicillium sp.* (B_1) vis-à-vis *Aspergillus niger*(D); *Alternaria sp.*(A);*Aspergillus flavus*(B_2) ; *Trichoderma sp.1*(A_3) ; *Aspergillus fumigatus*(K) ; *Trichoderma sp.2* (I), à montre une croissance très rapide par rapport au *Aspergillus flavus* (B_2) et *Alternaria sp.* (A). Et une croissance remarquable contre *Aspergillus fumigatus*(K) ; *Aspergillus niger*(D). Mais contre *Trichoderma sp.2*(I) ; et *Trichoderma sp.1* (A_3) elle ne marque aucune croissance (Figure 15).

Donc : *Penicillium sp.* (B_1) a un effet antagoniste contre *Aspergillus flavus* (B_2) et *Alternaria sp.* (A).

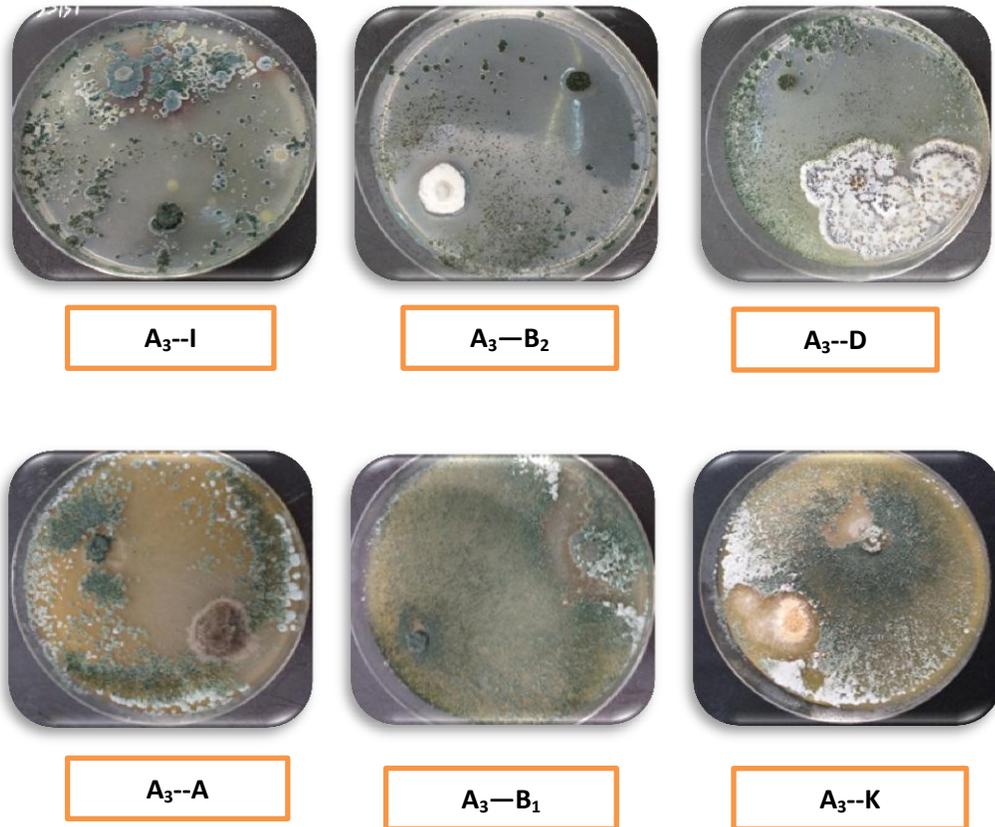


Figure 16: *Trichoderma sp.1* (A_3) vis-à-vis *Aspergillus niger* (D); *Alternaria sp.* (A); *Aspergillus flavus* (B_2); *Penicillium sp.* (B_1); *Trichoderma sp.2* (I); *Aspergillus fumigatus* (K).

Le repiquage simultané de *Trichoderma sp.1* (A_3) vis-à-vis *Aspergillus niger* (D); *Alternaria sp.* (A); *Aspergillus flavus* (B_2); *Penicillium sp.* (B_1); *Trichoderma sp.2* (I); *Aspergillus fumigatus* (K), à montre une croissance très rapide par rapport *Aspergillus niger* (D); *Alternaria sp.* (A); *Aspergillus flavus* (B_2); *Penicillium sp.* (B_1); *Trichoderma sp.2* (I); *Aspergillus fumigatus* (K) (Figure 16).

Donc : *Trichoderma sp.1* (A_3) a un effet antagoniste contre tous les souches testées.

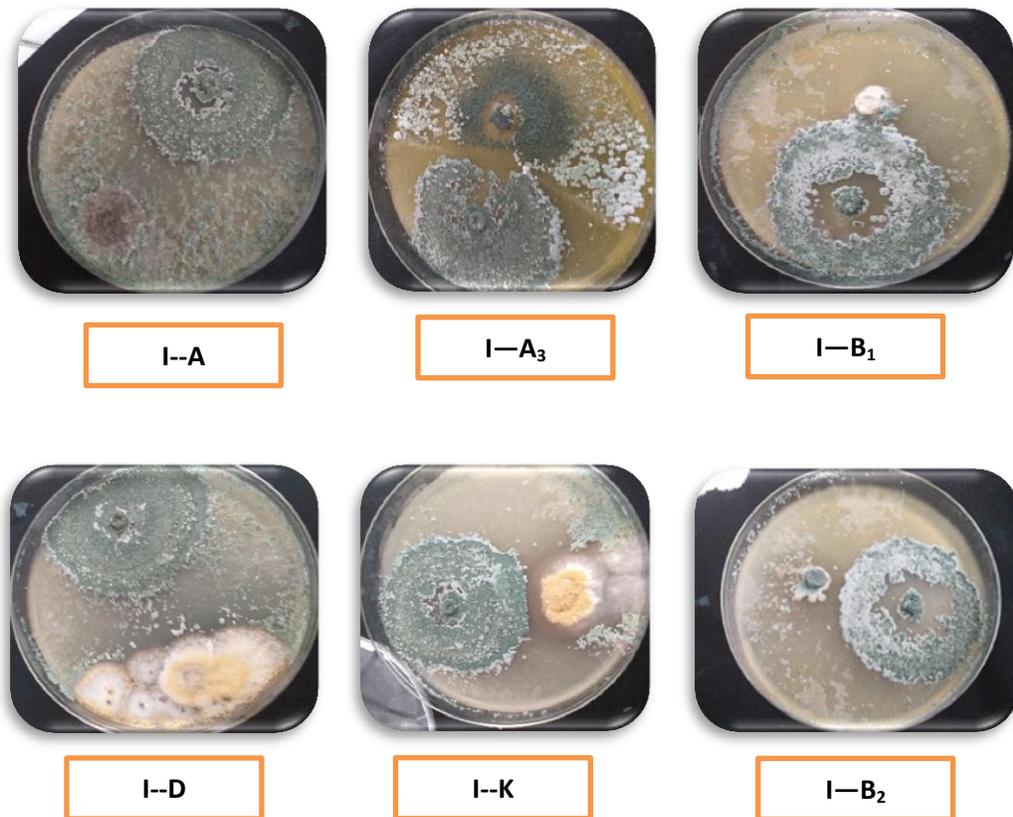


Figure 17 : *Trichoderma sp.2(I)* vis-à-vis *Aspergillus niger(D)* ; *Alternaria sp.(A)* ; *Aspergillus flavus(B₂)* ; *Penicillium sp. (B₁)* ; *Trichoderma sp .I(A₃)* ; *Aspergillus fumigatus(K)*.

Le repiquage simultané de *Trichoderma sp.2 (I)* vis-à-*Aspergillus niger(D)*; *Alternaria sp.(A)* ; *Aspergillus flavus(B₂)* ; *Penicillium sp. (B₁)*; *Trichoderma sp.I(A₃)* ; *Aspergillus fumigatus(K)*, à montre une croissance très rapide par rapport *Aspergillus niger(D)* ; *Alternaria sp.(A)* ; *Aspergillus flavus(B₂)*; *Penicillium sp. (B₁)*; *Trichoderma sp.I(I)* ; *Aspergillus fumigatus(K)* (Figure 17).

Donc : *Trichoderma sp.2(I)* a un effet antagoniste contre tous les souches testées.

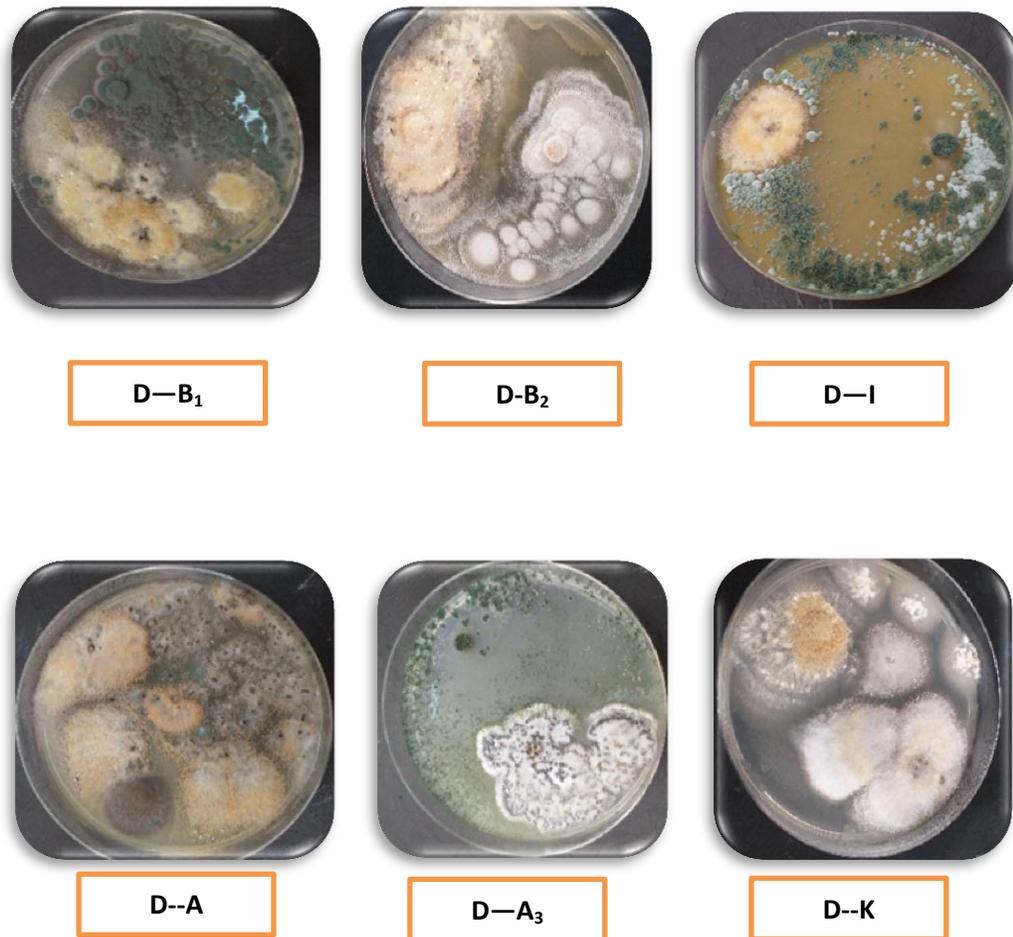


Figure 18 : *Aspergillus niger* (D) vis-à-vis *Alternaria sp.*(A); *Aspergillus flavus* (B₂); *Penicillium sp.* (B₁); *Trichoderma sp.1* (A₃); *Aspergillus fumigatus* (K); *Trichoderma sp.2*(I).

Le repiquage simultané de *Aspergillus niger* (D) vis-à-vis *Alternaria sp.* (A) ; *Aspergillus flavus* (B₂) ; *Penicillium sp.* (B₁) ; *Trichoderma sp.1* (A₃); *Aspergillus fumigatus* (K) ; *Trichoderma sp.2*(I) à montre une croissance très rapide par rapport *Alternaria sp.* (A). Et une croissance remarquable par rapport à *Penicillium sp.* (B₁) ; *Aspergillus flavus* (B₂) ; *Aspergillus fumigatus* (K). Mais contre *Trichoderma sp.1*(A₃) et *Trichoderma sp.2*(I) elle ne marque aucun effet (Figure 18).

Donc : *Aspergillus niger* (D) a un effet antagoniste contre *Alternaria sp.* (A).



Figure 19 : *Aspergillus fumigatus* (K) vis-à-vis *Alternaria sp.* (A) *Aspergillus niger* (D) ; *Penicillium sp.* (B₁) ; *Trichoderma sp.1* (A₃) ; *Aspergillus flavus* (B₂) ; *Trichoderma sp.2* (I).

Le repiquage simultané de *Aspergillus fumigatus* (K) vis-à-vis *Alternaria sp.* (A) ; *Aspergillus flavus* (B₂) ; *Penicillium sp.* (B₁) ; *Trichoderma sp.1* (A₃) ; *Aspergillus niger* (D) ; *Trichoderma sp.2* (I), à montre une croissance très rapide par rapport *Alternaria sp.* (A). Et une croissance remarquable par rapport à *Penicillium sp.* (B₁) ; *Aspergillus flavus* (B₂) ; *Aspergillus fumigatus* (K). Mais contre *Trichoderma sp.1* (A₃) et *Trichoderma sp.2* (I) elle ne marque aucun effet (Figure 19).

Donc : *Aspergillus fumigatus* (K) a un effet antagoniste contre *Alternaria sp.* (A).

On conclut à partir de la méthode de confrontation directe entre les différentes souches testées, que le genre *Trichoderma* a un effet inhibiteur dominant sur les genres testés.

Nos résultats sont en accord avec Rajendiran et *al.* (2010) qui ont montré l'effet inhibiteur de *Trichoderma* vis-à-vis de *Fusarium sp.*, *Penicillium sp.* et *Aspergillus sp.* L'inhibition de croissance de ces champignons est due à la nature de ce genre, sa croissance rapide, ses sécrétions des composés extracellulaires néfastes comme des antibiotiques, enzymes dégradantes la paroi cellulaire telles que des glucanases, endochitinases et chitinase.

7. Fermentation de la souche sélectionnée

La fermentation réalisée en erlenmeyers de 250 ml, ont permis après 8 jours de récupérer les filtrats pour la souche cultivée afin d'extraire les protéases et réaliser le dosage enzymatique(Figure20).



Figure 20 : Réalisation de fermentation dans des erlenmeyers de 250ml pour les différentes températures en fonction de la concentration de l'NaCl.

7.1. Résultats du pH

Les résultats du pH des filtrats des milieux de culture après fermentation sont mentionnés dans le tableau 16.

Tableau 16 : Résultats du pH pour la souche sélectionnée après fermentation.

Culture	NaCl (g/l)	Température	pH
1	1	30°C	7.20
2	1	37°C	6.58
3	2	30°C	6.79
4	2	37°C	6.72
5	2	53°C	4.89
6	5	30°C	6.83
7	5	37°C	6.33
8	5	53°C	5.06
9	10	30°C	7.20

Le tableau 16 montre qu'il y a une légère variation de pH du milieu de culture, qui reste globalement dans la neutralité. Cela pourrait s'expliquer par le fait que les déchets de tomates possèdent un excellent pouvoir tampon, c'est le cas pour la plupart des résidus agroindustriels (Chutmanop et *al.*, 2008).

De ce fait, le pH du milieu est affecté par les processus métaboliques, notamment enzymatiques. C'est pour cette raison que les variations du pH sont des indicateurs des changements dans les activités métaboliques (Sandhya et *al.*, 2005).

7.2. Résultats de l'activité protéolytique

L'activité enzymatique recherchée dans le milieu de fermentation solide à base de déchets tomates a montré que la production de protéase alcaline diffère d'une température à une autre en fonction de différentes concentrations de l'NaCl.

Tableau 17 : Résultats de l'activité protéolytique.

Culture	NaCl (g /l)	Température	Activitéprotéolytique (U)
1	1	30°C	1226.50
2	1	37°C	2539.75
3	2	30°C	146.98
4	2	37°C	2508.43
5	2	53°C	1226.50
6	5	30°C	1891.56
7	5	37°C	2421.68
8	5	53°C	848.19
9	10	30°C	2903.61

U:Ug/ml/h.

Les résultats montrés dans le tableau 17 sont mieux représentés dans les graphes suivants :

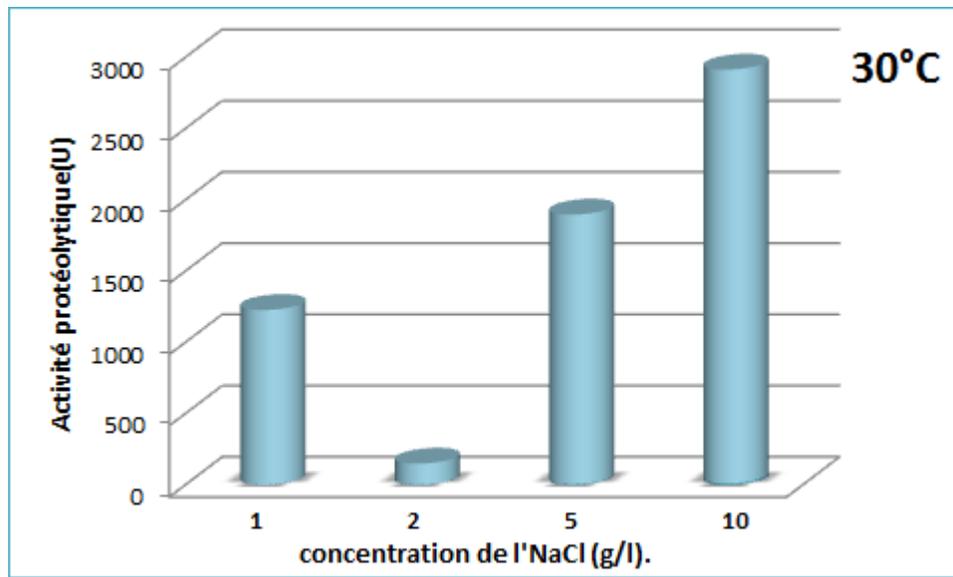


Figure 21 : Résultats de l'activité protéolytique pour la souche cultivée sous la température 30°C.

La simple observation du graphe (Figure 21) obtenu après fermentation à 30°C en fonction de différentes concentrations de l'NaCl montre que l'isolat sélectionné pour cette fermentation produit une quantité importante de protéase alcaline avec la concentration 10g/l de l'NaCl (2903.61U), par rapport aux autres concentrations (1g/l et 5g/l) qui révèlent une production moyenne, tandis que avec la concentration 2g/l la production de cette enzyme est très faible.

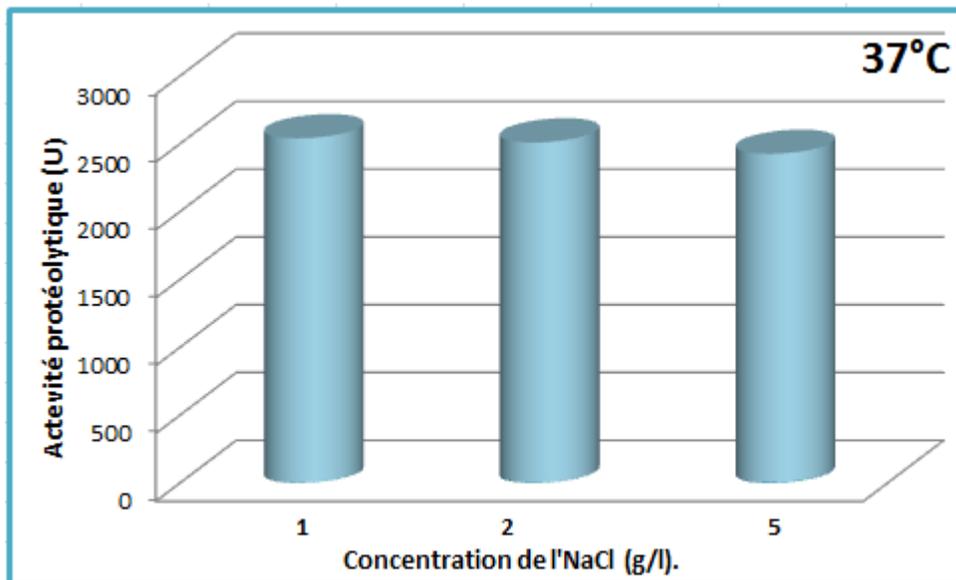


Figure 22: Résultats de l'activité protéolytique pour la souche cultivée sous la température 37°C.

Les résultats obtenus après la fermentation à 37°C (figure 22) en fonction de différentes concentrations de l'NaCl, montre que la moisissure sécrète une quantité considérable (d'environ 2400U) de la protéase alcaline avec tous les concentrations (1g/l ; 2g/l et 5g/l) de l'NaCl,

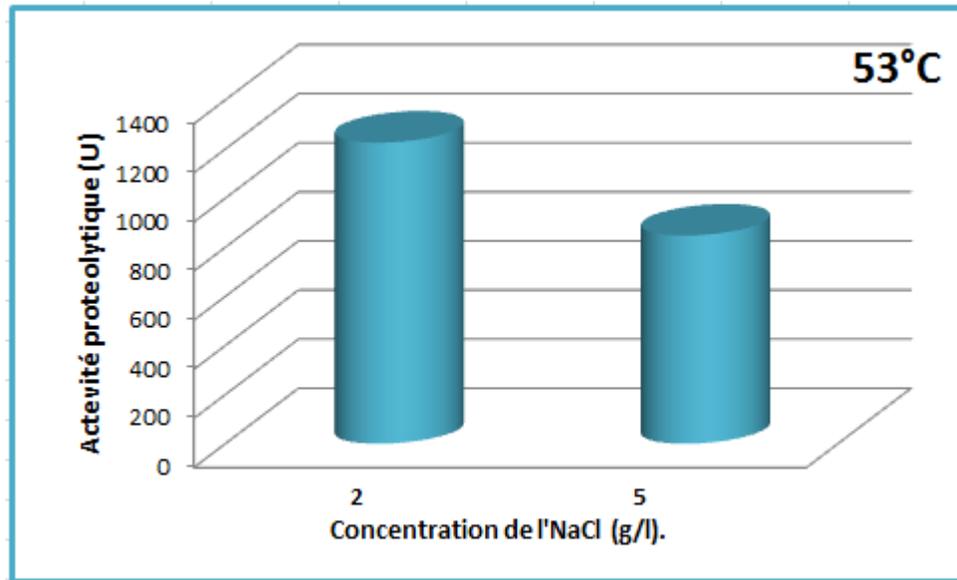


Figure 23: Résultats de l'activité protéolytique pour la souche cultivée sous la température 53°C.

Les résultats obtenus après la fermentation à 53°C (figure 23) en fonction de différentes concentrations de l'NaCl, montre que notre souche produit une quantité importante de l'enzyme ciblée avec la concentration 2g/l, mais cette production diminue avec la concentration 5g/l.

D'après nos résultats on observe qu'*Aspergillus niger* (D) produit la protéase alcaline sous toutes les températures étudiées, ainsi qu'avec les concentrations de l'NaCl testées. En effet, cette souche est probablement thermostable et halophile.

La comparaison de tous les résultats obtenus révèle que la souche *Aspergillus niger* (D) a donné l'activité protéolytique la plus élevée (2903.61U) avec la concentration de l'NaCl 10g/l à température 30°C. En conséquence, on peut conclure que cette enzyme est probablement thermostable et résiste bien à la salinité.

Cette thermostabilité et halophilie s'explique par l'emplacement géothermique constituant le site d'isolement de la souche, car la *Sebkha* dont on a fait notre échantillonnage favorise le développement d'un système enzymatique assez résistant par un renforcement des liens peptidiques en structure secondaire ou des résidus aromatiques dans la structure tertiaire (Sandgren, 2004). Généralement, la thermostabilité des enzymes s'explique également par la présence de certaines liaisons dans leurs structures secondaires et tertiaires (liaisons hydrogènes,

liaisons hydrophobes, interactions ioniques, liaisons avec métaux et ponts dissulfures) déterminée par des séquences particulières en acides aminés situés à des endroits stratégiques pour permettre aux enzymes de résister à la dénaturation thermique (Scriban, 1999). Par ailleurs, il a été démontré que la richesse en résidus cystéines et en glucides (glycosylation excessive) confère à la molécule enzymatique une grande intégrité structurale (Vielle et Zeikus, 2001) résistant à des températures élevées (Xu et *al*, 2002). En effet, la thermostabilité est un des critères de sélection des enzymes destinées (Tuncer et *al.*, 1999).

CONCLUSION

L'objectif principal de notre travail consiste à l'isolement de souches fongiques à partir d'une région climatiquement aride (Sebkha et sol de palmeraie de la région de Biskra). Le sol de cette localité est sableux, caractérisé par sa contenance pauvre en matière organique, sa salinité élevée et sa forte exposition au soleil, l'examen macroscopiques et microscopiques approfondis des moisissures isolées ont mis en évidence 26 souches réparties sur 4 genres différents : *Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria* et *Trichoderma*, dont *Aspergillus* est le plus dominant avec un pourcentage de 43%.

Parmi les quatre différentes activités enzymatiques testées (l'amylase, la caséinase, la gélatinase et la cellulase), les souches étudiées ont montré au moins une activité enzymatique.

Le test d'activité antibactérienne des isolats identifiés, qui consiste à rechercher l'activité antibactérienne sur le développement de la bactérie test : *E. coli*, a révélé que *Aspergillus niger* et *Aspergillus flavus* ont manifesté un effet antibactérien considérable.

Ils existent différents techniques pour étudier le test d'antagonisme. Notre travail est réalisé selon la méthode de confrontation directe. Le test d'activité de l'antagonisme (moisissure - moisissure) de 7 souches (*Alternaria sp.* ; *Aspergillus flavus* ; *Aspergillus fumigatus* ; *Aspergillus niger* ; *Penicillium sp.* ; *Trichoderma sp.1.* ; *Trichoderma sp.2.*) a révélé que les espèces de *Trichoderma* a développé une activité antifongique très importante.

D'après le test de la mise en évidence de l'activité protéolytique, la souche correspond à l'espèce d'*Aspergillus niger* a donné un diamètre de protéolyse le plus élevé de 26mm. Pour cela, elle a été sélectionnée pour la fermentation en milieu solide en utilisant les déchets de tomate comme un substrat de base.

Pour ce faire, la souche sélectionnée a étéensemencée dans des milieux de culture solides constitués par des déchets de tomate humidifiés par de l'eau distillée à différentes concentrations de NaCl (1g/l ; 2g/l ; 5g/l et 10g/l) puis incubées à différentes températures : à 30°C, à 35°C, à 40°C et 45°C. Après dosage enzymatique, la meilleure activité protéolytique obtenue a été notée dans le filtrat de la culture à concentration 10g/l de NaCl à température 30°C (2903.61U).

Perspectives

Au terme de cette étude, nous fixons certains points en perspectives :

- ❖ Identifier avec exactitude les souches, jusqu'au niveau de l'espèce par les caractéristiques physiologiques, chimio taxonomiques et moléculaires plus approfondies.
- ❖ Tester la présence d'autres enzymes : pectinase, chitinase, lipase, uréase, etc.
- ❖ Optimisation des paramètres de production des enzymes : pH du milieu et nature de l'agent humidifiant.
- ❖ Purification recommandée des enzymes pour une éventuelle utilisation en industrie alimentaire ou pharmaceutique.
- ❖ Extraction et identification des substances antibactériennes et antifongique par les méthodes plus performantes comme HPLC, CCM, etc.
- ❖ Réaliser des fermentations sur milieu liquide à base de déchets de tomate et comparer avec celles sur milieu solide.

Ait kaki-El-Hadef El-Okki A., Leghlimi H., Dakhmouche S., Bennamoun L., Meraihi Z. (2012). Utilisation de la planification expérimentale pour l'optimisation de la production de l' α -amylase par *Rhizopus oryzae*. *Rev. Microbiol. Ind. San et Environn.* 6, (1). 1-17.

Alexander M. (1991). Introduction to soil microbiology, (edn) Willy .NewYork

Alexopoulos C.J., Mims C.W., Blackwell M. (1996). Introductory Mycology (4 th Ed). P: 868. New York, USA.

Anonyme F. (2004). Grain fungal. Diseas & Mycotoxins Reference (USDA).GIPSA Technical Services Division, (edn) Hill BLVD. Kansas city.

Aouiche A., Bouras N., Mokrane S., Zitouni A., Schumann P., Spröer C., Sabaou N., Klenk HP. (2015). Actinokineospora mzabensis sp. Nov, à novel actinomycete isolated from Saharan soil. *Antonie van Leeuwenhoek*, 107:291–296.

Attalah M., Kacem –Caouche N. (1992). Production of ochratoxin A in a semisynthetic : « in the second Regional Mycological Conf. RMC 2 ». Cairo. Egypt.

Auberger B., Lamberet G., Lenoir J. (1985). Les activités enzymatiques de *Penicillium camemberti*. *Le lait.* 59 : 244-268.

Avramenko S.V., Galynkin V.A. (2010). Features of biosynthesis of chitinolytic enzymes by *Streptomyces griseus* Var. *Streptomycini*. *Applied Biochemistry and Microbiology.*46,(4). 405-408.

Bååthe E., Söderström B.E. (1980). Comparaisons of the agar-film and membranefilter methods for the estimation of the hyphal lengths in soil, with particular reference to the effect of magnification .*Soil Biol. Biochem.* 12: 385-387.

Barnett H.L., Barry B. (1972). Illustrated genera of imperfect fungi. 3émeEd. Burgess Publishing Company, 160p.

Bèguin P., Aubert J.P. (1994). The biological degradation of cellulose, *fems, microbiol. Rev.* 13, P: 25-58.

Belmessikh A. (2011). 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 liquide. Thèse de Magister. *Université des Frères Mentouri Constantine.* Algérie.

Ben bond L., Allison T.B. (2010). Temperature-associated increases in the globale soil respiration record. P: 579-582.

Benhamou N., Chet.L. (1996). Parasitism of sclerotia of *Sclerotium rolfsii* by *Trichoderma harzianum* ultrastructural and cytochemical aspects of the interaction. *Phytopathology* 86, P: 405-416.

Beynon R.J., Oliver S. (2004). Avoidence of proteolysis in extracts. *Mthods mol. Boil.*, 596: 81-93.

Bhat M.K. (2000). Cellulase and related enzymes. *In Biotechnology Advances* 18: 355-383.

Bloch E., Rachel R., Burgraff S., Hafend bradl., Jannasch H.W., Stetta O. (1997). *Pyrolobus fumarii* gen and sp. Nov presents a novel group of and archea. Extending the upper temperature limite for life to 113°C. *Extremophiles* .1: 14-22

Boiron P. (1996). Organisation et biologie des champignons. Edition Nathan.P:13-19-69-79.

Botton B., Breton A., Fevre M., Gauthier S., Guy P., Larpent J.P., Reymond P., Sanglier J.J., Vayssier Y., Veau P. (1990). Moisissures utiles et nuisibles. Importance industrielle. Masson. Paris. P. 12-426.

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

Boubetra D., Zitouni A., Bouras N., Mathieu F., Lebrihi A., Schumann P., Spröer C., Klenk HP., Sabaou N. (2013a). *Saccharothrix hoggarensis* sp. nov, a novel actinomycete isolated from Saharan soil. *Int J Syst Evol Microbiol.*, 63:549–553.

Boubetra D., Zitouni A., Bouras N., Mathieu F., Lebrihi A., Schumann P., Spröer C., Klenk HP., Sabaou N. (2013b). *Saccharothrix saharensis* sp. Nov, a novel actinomycete isolated from Algerian Saharan soil. *Int J Syst Evol Microbiol.*, 63:3744–3749.

Boubetra D., Zitouni A., Bouras N., Schumann P., Spröer C., Klenk HP., Sabaou N. (2015). *Saccharothrix tamanrassetensis* sp. Nov, an actinomycete isolated from Saharan soil in Algeria. *Int J Syst Evol Microbiol.*, 65:1316–1320.

Bouchet P.H., Giraud J.L., Vihard J. (1999). Les champignons : mycologie fondamentale et appliquée. Masson (ed). P: 5-10.

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

Bousseboua H. (2002). Elément de microbiologie générale. Université Mentouri Constantine. Ed Campus club. P : 10-16, 238-239, 231-232.

Brock T.D. (1995). The road to yellow stone and beyond . *Annu. Rev. Microbiol.* 49: 1-28.

Chabasse D., Bouchara J.P., De Gentile L., Brun S., Cimen B., Penn P. (2002). Les moisissures d'intérêt médical. Cahier de formation biologie médicale. Edition Bioforma. Paris. P. 11, 53, 55, 57, 59, 81, 85, 93, 102, 103, 109.

Chabasse. D., Penn P., Cimon B., Bouchara J ; De Gentile L., Brun S. (2002). Les moisissures d'intérêt médical. Cahier N°25 de formation de biologie médicale.

Chacraborty S., Khopade A., BiaoJian W., Liu X., et al.,(2011). Characterization and stability studies on surfactant,detergent and oxydant stable α -amylase from marine haloalkaliphilic *Saccharopolyspora* sp. *A9.J.Mol.Cat.B: Enz.*68(1),52-58.

- Christensen M. (1989).** A view of fungal ecology. *Mycologia*. 81 :1-19.
- Chutmanop J., Chuichulcherm S., Chisti Y., Srinophakun P., (2008).** Protease production by *Aspergillus oryzae* in solid-state fermentation using agroindustrial substrates. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 83: 1012–1018.
- Collier L., Balows A., Sussman M. (1998).** Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections, 9, (4). Arnold, London, Sydney, Auckland, New York.
- Conner D.E., Beuchat L.R. (1987).** Heat resistance of ascospores of *Neosartorya fischerias* affected by sporulation and heating medium. *International Journal of Food Microbiology*, 4: 303-312.
- Cooney D.G., Emerson R. (1964).** Thermophilic fungi . An account of their biology activities and classification W.H Freeman & Co –San Francisco – Clife.
- Dahot M. O. (1987).** Studies on proteolytic enzyme. Part I. Characteristics of protease synthesis by *Penicillium expansum*. *Pakistan J. Sci. Ind. Res.* 30 (3): 194-196.
- Dai Z., Mao X., Magnuson J.K., Lasure L.L. (2004).** Identification of genes associated with morphology in *Aspergillus niger* by using suppression subtractive hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* 70 (4): 2474-2485.
- DasSarma S., Arora P. (2001).** Halophyles. Encyclopedia of life native. Publishing Groupe.
- Davet P. (1996).** Vie microbienne du sol et production végétale. INRA. Paris. P. 5257.
- Davet R. (1997).** La Communauté Fongique : Son organisation et rôle dans l'écosystème. *Marcel Dekker, Inc., New York*.
- Davidson R., Gertler A., Hofmann T. (1975).** *Aspergillus oryzae* acid proteinase. Purification and properties, and formation of pi-chymotrypsin. *Biochem. J.* 147 (1):45-53.
- De Hoog G.S., Guarro J., Gene J., Figueras M. J. (2000).** Atlas of Clinical Fungi, 2nd ed, vol.

1. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands.

Delgado-Jarana J., Rincon A.M., Benitez T. (2002). Aspartyl protease from Development of Novel Real-Time PCR Assays for Detection and Differentiation of Eleven Medically Important *Aspergillus* and *Candida* Species in Clinical Specimens, *J. Clin. Microbiol.*, 45 (3), 906-914.

Demain A.L. (2000). Microbiol Biotechnology (feature). Trends in biotechnology. 18(1), P: 26-31.

Dendouga W. (2006). Isolement et identification de moisissures productrices de protéases à partir de milieux extrêmes. Extraction et étude des propriétés de la protéase produite, P : 53.

Devi M.K., Banu A.R., Gnanaprabhal G.R., Pradeep B.V., Planiswamy M. (2008). Purification, characterization of alkaline protease enzyme from native isolate *Aspergillus niger* and its compatibility with commercial detergents. *Indian J. Sci. Technol.*, 1(7) : 1-6.

Djibril Djigal. (2003). Interactions entre la communauté microbienne du sol (bactéries et champignons mycorhizes) et les nématodes bactéricivores: effet sur la nutrition minérale et la croissance de différentes plantes. P: 9-13.

Drouin M. (2005). Étude de production de protéases alcalines par *Bacillus licheniformis* en utilisant des boues d'épuration municipales comme substrat (Doctoral dissertation, Université du Québec, Institut national de la recherche scientifique).

Duce R.G., Thomas S.B. (1959). The microbiological examination of Butter. *J. Appl. Dact.* 22: 52.

Durand G., Monson P. (1982). Les enzymes. Production et utilisations industrielles. Bordas. Paris. P: 36- 153.

Edgerton, M.E., Brimblecome P. (1981). Thermodynamics of halobacterial environments. *Can J Microbel.* P : 899-909.

Fernandez-Lahore H.M., Fraile E.R., Cascone O. (1998). Acid protease recovery from a solid

fermentation system. *J. Biotechnol.* 62: 83-93.

Florent J. (1993). Les moisissures. In (Microbiologie industrielle, les micro-organismes d'intérêt industriel). Ed. Lavoisier Tec et Doc. Paris. PP. 112-162.

Frazier W.C. (1967). Food microbiology. Academic presse. London. P. 3-429.

Genevès L. (1990). Champignons. In (Biologie Végétale : thallophytes et microorganismes). Ed. DUNOD. Paris. PP. 59-90.

Giraud J. (1998). Microbiologie alimentaire . Edition Donod, Paris. P 8-101.P 330.

Gund-Cimerman N., Zalar P., Shoog G., Plemenicas A., Caron P.A. (2002). Hypersalin waters in saltturns- natural ecological niche for halophilic blacks yeasts. *FEMS. Microbiol. Ecol.* 32: 235- 240.

Gunde-Cimerman N., Zalar P., de Hoog S., Plemenitaš A. (2005). Hypersaline waters in salterns e natural ecological niches for halophilic black yeasts. *FEMS Microbiol Ecol.* 32: 235–240

Harrigan W.F., McCance M.E. (1976). Laboratory methods in food and dairy microbiology. Academic press. London. P. 21-277.

Hausnnert K., Hilgendor P., Hofbauer C., Demeester J., Lauwers A. (1996). New international F.I.P. method for the determination of the activity of *Asprgillus oryzae* proteases. *Pharmazie.* 51 (12): 946-50.

Hawksworth D.L., Kirk P.M., Sutton B., Pegler D.N. (1995). Dictionnaire of the fungi, 8th ed. CAB.International Walling Ford. UnitedKingdom.

Indge B. (2004). La biologie de A à Z. 1100 définitions, édition : Dunod, Paris, P : 344.

Issac S., Frankland J.C., Watling R., Whalley A.J.S. (1993). Airworth and Bishys Dictionary of the Fungi (8 th Ed.). CAB International, Wallingford, United Kingdom. P: 616.

Jernejc K., Cimerman A. (2001). Morphological characteristics, extracellular and intracellular protein and enzyme patterns of five *Aspergillus* species. *Food Technol. Biotechnol.* 39 (4): 333-340

John Wiley Sons, Ltd : Chichester.USA.3 P : 1-10.

Keyhani NO., Roseman S. (1999). Physiological aspect of chitin catabolism in marine bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta.* (14)73: 108-112.

Kieser T., Bibb M. J., Dutnner M. j., Chater K. F., Hopwood D. A. (2000). General introduction to actinomycete biologie in practical *Streptomyces* genetics. The John Innes Foundation, Crowes, Norwich, England. 1-21.

Killington P., Paget T., Nicklin J., et Graeme-cook K. (1999). L'essentiel en microbiologie. P: 230-235.

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

Kumar A.G., Nagesh N., Prabhakar T.G., Sekaran G., (2008a). Purification of extracellular acid protease and analysis of fermentation metabolites by *Synergistes sp.* Utilizing proteinaceous solid waste from tanneries. *Bioresour. Technol.* 99 ; 2364–2372.

Kumar D., Savitri., Thakur N., Verma R., Bhalla T.C., (2008b). Microbial proteases and application as laundry detergent additive. *Res. J. Microbiol.* 3(12) ; 661–672.

Larone D.H. (1995). Medically Important Fungi - A Guide to Identification, 3rd ed. ASM Press, Washington, D.C.

Larpent-Gourgaud M., Sanglier J.J. (1992). Biotechnologies. Principes et méthodes. Doin. Paris. P. 574-587.

Lateef A., Oloke J K., Gueguim-Kana E.B., Adebayo I. (2004). Aspects of the isolation and characterizat on of thermostable α -amylase from *Alternaria alternata*. *Global Journal of Pure and Applied Sciences*, 10, (1): 75-79.

Lecleche B. (2000). Agronomie des bases à nouvelle orientation. PP: 338.

Leclerc H., Gaillard J.L., Simonet M. (1995). Microbiologie générale. La bactérie et le monde bactérien. Ed : Doin, Paris.133-134.

Leisola M., Jokela J., Pastinen O., Turune O., Schoemaker H. (2001). Industrial use of enzymes. Eolss Publishers, Oxford.

Lenoir J., Auberger B. (1977). Les caractères du système protéolytique de *Penicillium caseicolum*.

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

Leveau S.B., Bouix M. (1993). Les microorganismes d'intérêt industriel. Lavoisier microbiologique de la sécurité et de la qualité des aliments. Lavoisier. Paris. P. 216-244.

Madigan M.T., Matinoko J.M., Parker J. (1997). Brok biology of microorganisms, 8th edn.USA.

Maheshwari R., Bradwa J.G., Bhat M.K. (2000). Thermophilic fungi their physiology and enzymes. *Microbiology and Molecular Biology Reviw s*. 64(3): 461- 488.

Maier R.M., Pepper I.L., Gerba C.P. (2000). Environmental microbiology. Microorganisms in surface soils. In. Acadimic press. A Harcourt sciencead technology company. Canada. P: 79-82.

Malinowski D.P., Allouch G.A., Blesky D.P. (2000). Leaf endophyte *Neotyphodium coenophialum* modifies mineral uptake in talle fescus. *Plant Soil*. 227: 115-126.

Malloch D. (1997). Moulds isolation, cultivation and identification. University of Toronto Http//

www. Botany.utoronto.ca/researchlabs/malloch/moulds/html.

Marouf A., Reynaud J. (2007). La botanique de A à Z. Edition : Paris. P342.

Mechakra A., Auberger B., Remeuf F., Lenoir J. (1999). Optimisation d'un milieu de culture pour la production d'enzymes protéolytiques acides par *Penicillium camemberti*. *Sci. Aliments*, 19 ; 663–675 caractérisation d'une protéase neutre. *Le lait*, 57 ; 471-489.

Mehravar M., 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.

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

Mobini-Dehkordi M., Fahime A.J. (2012). Application of alpha-amylase in Biotechnology. *Journal of Biology and Today's world*. 39-50.

Modler H.W., Brunner J.R., Stine C.M. (1974). Extracellular protease of *Penicillium roqueforti*. Production and characterization of crude enzyme preparation. *J. Dairy Sci.* 57 (5): 523-543.

Mouchacca J. (1997). Thermophilic fungi . Biodiversity and Taxonomic Status. *Cryptogamies. Mycol.*18:19-69. 130

Mouchacca J. (1999). Thermophilic fungi: present taxonomic concepts in thermophilic moulds in biotechnology, (edn) Johri. S.N. Satyanarayana and Oren J .Kluver. Dordrecht

Nannipieri P., Ascher J., Ceccherini M.T. (2003). Diversité microbienne et la fonction des sols. P: 655, 670.

Nicklin J., Graeme-Cook K., Paget T., Killington R. (2000). Essential en Microbiologie. PP : 209.

Ningthoujam D. S., Kshetri P., Sanasam S., Nimaichand S. (2009). Screening, Identification of Best Producers and Optimization of Extracellular Proteases from Moderately Halophilic Alkalithermotolerant Indigenous Actinomycetes. *World Applied Sciences Journal* 7: 907-916

Nishio N., Nagai S. (1981). Single cell protein production from mandarin orange peel. *European J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1: 156-160.

Odier F., Rouau X. (1985). Les cellulases et les enzymes de dépolymérisation de la lignine p.199-214.in : Mouranche A., C. (ed), Hydrolases et dépolymérase. Enzyme d'intérêt industriel. Edition Gauthier-Villard, Paris.

Paranthaman R., Alagusundaram K., Indhumathi J. (2009). Production of protease from rice mill wastes by *Aspergillus niger* in solid state fermentation. *World J. Agric. Sci.* 5(3): 308-312.

Patel R., Dodia M., Singh S.P. (2005). Extracellular alkaline protease from a newly isolated haloalkaliphilic *Bacillus sp.* : Production and optimization. *Process Biochemistry*, 40(11), 3569-3575.

Pelmont J. (1995). Enzymes : catalyseurs du monde vivant (No. 577.15 PEL).

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

Perkkarién A., Jones B.L., Niku-Paalova M.L. (2002). Purification and properties of an alkaline proteinase of *Fusarium culmorum*. *Eur. J. Biochem.* 269: 798-807.

Petit J., Jobin P. (2005). La fertilisation organique des cultures Les bases. Fédération d'agriculture biologique du Québec.

Pinky P. (2012).In vitro Cellulose Rich Organic Material Degradation by Cellulolytic *Streptomyces albospinus* (MTCC 8768).*Mal. J. Microbiol.* 8(3): 164-169.

Prescott., Harly., Klein. (1995). Microbiologie. 2th ed. Debroeck-wesmael. Bruxelles .

Punt P.J., Van Biezen N., Conesa A., Albers A., Mangnus J., Van den Hondel C. Ramirez C. (1982). Manual and atlas of the *Penicillium*. Elsevier Biomedical Press, Amsterdam.

Quénéa K. (2004). Etude structurale et dynamique des fractions lipidiques et organiques réfractaires de sols d'une chronoséquence forêt/maïs (CESTAS, Sud ouest de la France). Thèse de Doctorat. Université de Paris 6 (France).

Rajendiran R., Jegadeeshkumar D., Sureshkumar B.T., Nisha T. (2010). In vitro assessment of antagonistic activity of *Trichoderma viride* against post harvest pathogens. *Journal of agricultural Technology*.6:31-35.

Rao M.B., Tanksale A.M., Ghatge M.S., Deshpande V.V. (1998). Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 62: 597–635.

Raven P.H., Evert Ray F., Eichhorn Susan E. (2000). Biologie végétale, Edition : Paris P : 968.

Receveur V., Czjzek M., Schulein M., Panine P., Henrissat B. (2002). Dimension, shape, and conformational flexibility of a two-domain fungal cellulase in solution probed by small angle X-ray scattering. *The journal of Biological Chemistry*. 277(43): 40887-40892.

Rugsaseel S., Morikawa S., Kirimura K., Usami S. (1995). Stimulation of citric acid production in *Aspergillus niger* by addition of viscous substances in shake culture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 42 : 839-843.

Samson A.R., Hoekstra E.S., Van Oorschot C.A.N. (1981). Introduction To Food-Borne Fungi. Institute of the Royal Netherlands Academy of Arts and Science. P: 4 - 42.

Sandgren M., Ståhlberg J., Mitchinson C. (2004). Structural and biochemical studies of GH family 12 cellulases: improved thermal stability, and ligand complexes. Elsevier Review.

Sandhya C., Sumantha A., Szakacs G., Pandey A. (2005). Comparative evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid-state fermentation. *Process Biochem.*, 40: 2689-2694.

Schnürer J., Clarholm M., Rosswall T. (1985). Microbial biomass and activity in an agricultural soil with different organic matter contents. *Soil Biol. Biochem.* 17:611-618.

Scriban R. (1993). Biotechnologie. Technique de documentation- Lavoisier (éd.) p : 32-690. 4^{ème} édition. Significance of Mold Species in Norwegian Drinking Water, *Appl. Environ. Microbiol.*, 72 (12), 7586-7593.

Scriban R. (1994). Biotechnologie, 4^{ème} Ed. P : 42-53.

Scriban R. (1999). Biotechnologie.. 4^{ème} édition. Technique de documentation Lavoisier (éd). P:32-690

Senal J., Fraselle J., Impens R., Kummert J., Lepoivre Ph., Meulmans M., Seilleur P., Vandevcken J., Viseur J. (1993). Traité de pathologie végétale. Gembloux. Belgique.

Shiladitya D., Pariya D. (2012). Halophiles.

Siezen R. J. (1988). Enzyme engineering in de zuivel. *Nizo-Nieuws.* 22 (10): 21-25.

Singh A. (1999). Engineering enzyme properties, *Indian Journal of Microbiology*, (39). 2: 65–77.

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

Sodek K. J., Hofman T. (1970). Large-scale preparation and some properties of penicillopepsin, the acid proteinase of *Penicillium janthinelum*. *Can. J. Biochem.* 48: 425-431.

Soufiane B. (1998). Isolement à partir de la rhizosphère des conifères de Bactéries et d'actinomycètes antagonistes aux champignons phytopathogènes. Canada, PP56.

St-Germain G., Summerbell R. (1996). Identifying Filamentous Fungi - A Clinical Laboratory Handbook, 1st ed. Star Publishing Company, Belmont, California

Strullu D.G. (1991). Les mycorhizes des arbres et des plantes cultivées .Edition : Tec et Doc. Lavoisier, Paris .P :248.

Subler S., Kirsh K.S. (1998). Spring dynamic of soil carbon, nitrogen and microbial activity in earthwarm middens in no-tillcornfield. *Bio. Fert. Soils.* 26 :243-249.

Sumner M.E. (2000). Handbook of soil science. CRC Press. Boca Raton. FL.

Sutton D.A., Fothergill A.W., Rinaldi M.G. (1998). Guide to Clinically Significant Fungi, 1st ed. Williams & Wilkins, Baltimore

Swann E.C., Frieders E.M., McLaughlin D.J. (1999). Microbotryum, Kriegeria and the changing paradigm in basidiomycete classification. *Mycologia* 91: 51-66.

Tanji K.K. (1990). The nature and extent of agricultural salinity problems. P :1-17. In ASCE manuals and reports on engineering practice. No.71. *Am. Soc. Civil Eng.* New York.

Tanji K.K. (1996). Agricultural salinity assessment and management. *Am. Soc. Civil Eng.* .New York.

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

Tensey M.R., Brock T.D. (1978). Microbial life at high temperature, aero logical aspect, (edn) Kushner. Life in extreme environments. Academic press.Ltd. London.United Kingdom.

Tuncer M., Balli A.S., Rob A., Wilson M.T. (1999). Optimization of extracellular lignocellulolytic enzyme production by a termophilic actinomycete *Termomonospora fusca* BD25.*Enzyme and Micribiol Technology.*25.P: 38-47.

Urbanek H., Yirdaw G. (1984). Hydrolytic ability of acid protease of *Fusarium culmorum* and its possible role in phytopathogenesis. *Acta Microbiol. Pol.* 33 (2): 131.

- Vidyalakshmi R., Paranthaman R., Indhumathi J. (2009).** Amylase Production on Submerged Fermentation by *Bacillus* spp. *World Journal of Chemistry* 4 (1): 89-91.
- Vieille C., Gregory J.Z. (2001).** Hyperthermophilic Enzymes: Sources, Uses, and Molecular Mechanisms for Thermostability *.Microbiology and Molecular Biology Reviews .* 65(1):1-43.
- Wild A. (1993).** Soils and environment, An introduction, Campridge University press, Campridge. pp. 281. In. Campridge price editions.
- Williams., Cross (1971).** Isolation, purification, cultivation and preservation of *actinomycetes*. *Methods Microbiol.* 4 : 295-33.
- Wu T.Y., Mohammad A.W., Jahim J.Md., Anuar N. (2006).** Investigations on protease production by a wild-type *Aspergillus terreus* strain using diluted retentate of pre- filtered palm oil mill effluent (POME) as substrate. *Enzyme Microb. Technol.*, 39 ; 1223-1229.
- Xu B., Hellman U., Ersson B., Janson J.C. (2000).** Purification, characterisation and aminoacid sequence analysis of a thermostable, low molecular mass endo- β -1,4-glucanase from blue mussel, *Mytilus edulis*. *Euro. J. Biochem.*267.4970-4977.
- Zhou X., Huang J., Ou Z., Wang H., Wang R. (2000).** Conditions of enzyme production and properties of alkaline lipase by *Streptomyces* Z94-2. *Wei sheng Wu Xue Bao.*40, 75-79.
- Zitouni A., Lamari L., Boudjella H., Badji B., Sabaou N., Gaouar A., Mathieu F., Lebrihi A., Labeda DP. (2004) .** *Saccharothrix algeriensis* sp. Nov.a new species isolated from a Saharan soil. *Int J Syst Evol Microbiol.*, 54:1377–1381.

ANNEXES 01: Milieux pour tests enzymatiques

- **Potato Dextrose Agar (PDA)**

Pomme de terre 200 g

Glucose 20 g

Agar 20 g

Eau distillée compléter jusqu'à 1000 ml

- Laver la pomme de terre non pelée.
- Couper en cubes dans 500 ml d'eau distillée.
- Porter à ébullition pendant 30 – 45 min.
- D'autre part faire fondre l'agar dans 500 ml d'eau distillée.
- Écraser la pomme de terre, filtrer puis ajouter le filtrat à la solution d'agar.
- Ajouter le glucose.
- Compléter le volume à 1000 ml.
- ajuster le pH= 6,4 ± 0,2 à 25°C
- Stériliser par autoclavage à 121° C / 15 min.

- **Milieu Czapek**

NaNO₃..... 2g

K₂HPO₄..... 1g

MgSO₄, 7H₂O..... 0,5g

KCl.....0,5g

FeSO, 7H₂O.....0,01g

Saccharose.....30g

Agar.....15g

Eau distillée.....1000 ml

- pH 5, stérilisation par autoclave à 120°C pendant 20 minutes

- **Milieu PDA à amidon 1%**

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

pH= 5

- **Préparation de l'extrait pomme de terre** 200g 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 ,filtrés ,compléter à 1L d'eau distillée

Préparation de milieu de culture

L'agar et le glucose et l'amidon dissous à chaud dans l'extrait, compléter à 1L d'eau distillée

- **Gélose nutritive à la gélatine**

Peptone.....	5 g
Extrait de viande.....	3 g
Gélatine.....	4 g
Agar.....	15 g
Eau distillée.....	1000 ml

pH =7

- **La gélose à la cellulose**

Cellulose.....	0.5 g
NaNO ₃	0.1 g
K ₂ HPO ₄	0.1 g
MgSO ₄	0.05 g

Extrait de levure0.05 g

Agar.....15 g

pH= 7

- **Lait gélosé à 20% d'agar**

Lait écrémé.....100 ml

Agar-agar20 g

Eau distillée.....1000 ml

- Dissoudre l'agar-agar dans de l'eau distillée chaude.
- Agiter jusqu'à homogénéisation pour obtenir l'eau gélosée.
- Stérilisation par autoclavage à 121°C/20 min.
- Ajouter le lait écrémé stérile juste avant l'utilisation du milieu

Annexe 2: Les indicateurs colorés

- **Rouge Congo**

Rouge Congo.....0.1g

Eau distillé100ml

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

- **Acétate de cuivre à 7.5%**

Acétate de cuivre7.5g

Eau distillée.....100ml

- dissoudre 7.5 g de l'acétate de cuivre dans un petite volume d'eau distillée puis compléter le volume jusqu'à 100ml

- **Eau iodée (*Lugol*)**

Iode..... 1g

Iodure de potassium.....2g

Eau distillé.....100ml

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

- **La solution de *chloride de mercure***

HgCl₂.....15g

HCl concentré.....20 ml

Eau distillée.....100 ml

- **Annexe 3 : Eau Physiologique**

La solution est généralement composée d'eau distillée et de chlorure de sodium (NaCl) dilué à 9 pour 1000 (= solution à 0.9% (masse/volume) de NaCl, soit 9 g/l⁻¹).

- **Annexe 4 : Dosage de l'activité protéolytique**

- Solutions utilisées

- Caséine 2,5% dans Citrate de Sodium (0.02 M).
- Solution mère 100 µg/ml de Tyrosine.
- TCA 4%.
- Na₂CO₃ 15% dans NaOH (0.1 N).
- *Folin-Ciocalteu* 1/4^{ème}.

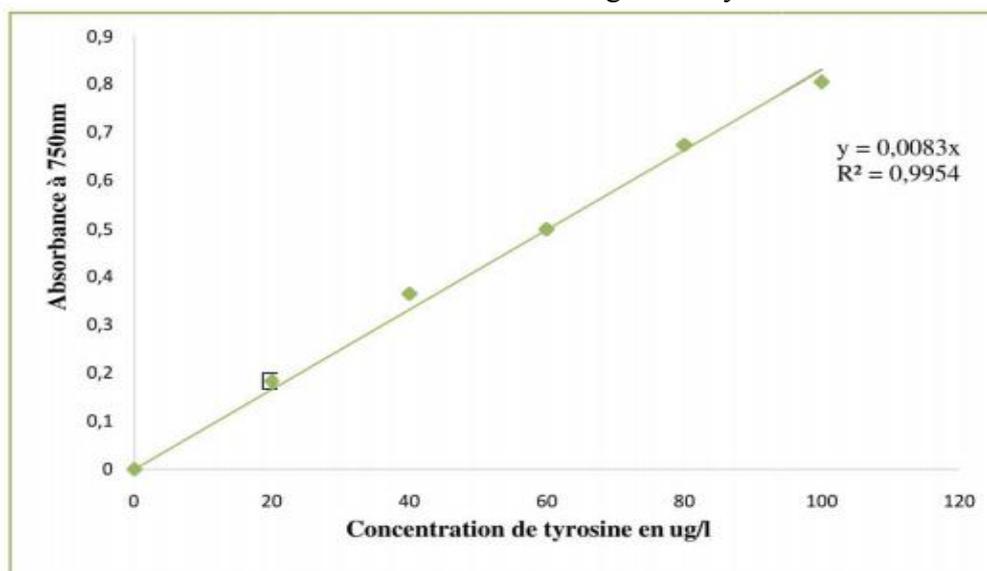
Protocole suivi :

Dilution	Blanc	1	2	3	4	5
Solution mère de Tyrosine (ml)	0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
TCA (ml)	0.5	0.4	0.3	0.2	0.1	0
Na ₂ CO ₃ (ml)	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
Agitation et incubation pendant 10 min à T° ambiante.						
Folin 1/4	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25

Agitation vigoureuse du mélange, puis incubation 30 min à température ambiante à l'obscurité. En fin, lecture de la densité optique à 750 nm.

Une unité de protéolyse correspond à la libération de 1 µg de tyrosine résultante de l'hydrolyse enzymatique par heure et dans un ml d'échantillon (1µg/h/ml). La concentration déduite de la courbe d'étalonnage correspond à 0.5 ml d'échantillon dilué par les réactifs ajoutés au cours de la première étape.

Annexe 4: La courbe d'étalonnage de la tyrosine.



Abstract

The objective of our approach is to isolate fungal strains from two soil samples from a climatically arid region (*Sebkha EL MGHIER* from the Biskra region). Two samples were taken, one at from a soil close to the *Sebkha*; while the other at the level of palm grove surrounding this lake. In-depth macroscopic and microscopic examination of isolated molds revealed 26 strains spread over 4 different genera: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Altarnaria* and *Trichoderma*. In fact, the first part of this research work focused on the demonstration of hydrolase activities in these fungal strains identified. Next, test for antibacterial activity on the development of the test bacterium: *E. coli*. Subsequently, the test of activities of the direct antagonism (mold-mildew) of the 4 genera studied. As a result, among the four different enzymatic activities tested (amylase, caseinase, gelatinase and cellulase), the strains studied showed at least one enzymatic activity. The second test revealed that *Aspergillus niger* and *Aspergillus flavus* showed considerable antibacterial effect. Moreover, the direct antagonism test has shown that the genus *Trichoderma* develops a very important antifungal activity. The final step in this work is to determine the ability of a fungal strain to use tomato waste at different temperatures for the production of the alkaline protease. To do this, the selected strain was seeded in solid culture media based on tomato waste at different concentrations of NaCl (1 g / l, 2 g / l, 5 g / l and 10 g / l) and then incubated at temperatures at 30 ° C, 37 ° C, and 53 ° C. The best proteolytic activity was noted in the concentration 10g / l under the temperature 30 ° C. This protease is previously thermostable and halophilic, because the geothermal site constituting the isolating site (*Sebkha EL MGHIER*) of the strain promotes the development of a rather resistant enzymatic system.

Keywords: *Sebkha* of *EL MGHIER*; Halophilic mold; Thermostable enzyme; Soil of arid zone; Antibacterial substance; Antifungal activity.

ملخص

الهدف من منهجنا هو عزل سلالات فطرية من عينتين من التربة من منطقة قاحلة مناخياً (سبخة المغير من منطقة بسكرة). من تربة قريبة من السبخة ؛ بينما الآخر على مستوى بستان النخيل المحيط بهذه البحيرة. كشف الفحص العياني والمجهري للقوالب المعزولة عن 26 سلالة موزعة على 4 أجناس مختلفة: الرشاشيات والبنسيليوم والتارناريا وتريكودرما. في الواقع ، ركز الجزء الأول من هذا العمل البحثي على اظهار أنشطة المحللة لهذه السلالات الفطرية المحددة. بعد ذلك ، اختبار لنشاط مضاد للجراثيم على تطوير بكتيريا الاختبار *E.coli*: بعد ذلك ، تم اختبار أنشطة العداء المباشر (العفن الفطري) للأجناس الأربعة. نتيجة لذلك ، من بين الأنشطة الأنزيمية الأربعة المختلفة التي تم اختبارها (الأميليز ، الكازيناز ، الجيلاتيناز والسلولاز) ، أظهرت السلالات نشاطاً إنزيمياً واحداً على الأقل. وكشف الاختبار الثاني أن *Aspergillus niger* و *Aspergillus flavus* أظهرتا تأثيراً مضاداً كبيراً للجراثيم. علاوة على ذلك ، أظهر اختبار العداء المباشر أن جنس الترايكوديرما يطور نشاطاً مضاداً للفطريات مهماً للغاية. الخطوة الأخيرة في هذا العمل هي تحديد قدرة سلالة فطرية على استخدام نفايات الطماطم في درجات حرارة مختلفة لإنتاج البروتيني القلوي. للقيام بذلك ، تم زرع السلالة المختارة في وسط استزراع صلب بناءً على نفايات الطماطم بتركيزات مختلفة من كلوريد الصوديوم (1 جم / لتر ، 2 جم / لتر ، 5 جم / لتر و 10 جم / لتر) ثم حضنت في درجات حرارة عند 30 درجة مئوية ، 37 درجة مئوية ، و 53 درجة مئوية. ولوحظ أفضل نشاط تحلل البروتين في تركيز 10 جم / لتر تحت درجة حرارة 30 درجة مئوية. هذه الأنزيمات البروتينية كانت في السابق مضادة للحرارة ، لأن موقع الطاقة الحرارية الأرضية الذي يشكل موقع العزل (سبخة المغير) للسلالة يشجع على تطوير نظام أنزيمي مقاوم إلى حد ما.

كلمات البحث: سبخة المغير. العفن الملحي. الانزيم مضادة للحرارة. تربة المنطقة القاحلة ؛ مادة مضادة للجراثيم. نشاط مضاد للفطريات.

**THÈME : ETUDE DE QUELQUE ACTIVITÉ MÉTABOLIQUE DES SOUCHES
FONGIQUES ISOLÉE À PARTIR DE *SEBKHA D'EL MGHIER DE LA RÉGION
DE BISKRA ALGÉRIENNE* .**

Mémoire de fin de cycle pour l'obtention du diplôme de Master en Mycologie et
Biotechnologie Fongique

Résumé: L'objectif de notre approche consiste à l'isolement de souches fongiques à partir de deux échantillons du sol d'une région climatiquement aride (*Sebkha EL MGHIER* de la région de Biskra). En effet, deux prélèvements ont été effectués, un au niveau d'un sol proche de la *Sebkha* ; tandis que l'autre au niveau du sol de palmeraie environnant ce lac. L'examen macroscopique et microscopique approfondis des moisissures isolées a mis en évidence 26 souches réparties sur 4 genres différents : *Aspergillus*, *Penicillium*, *Altarnaria* et *Trichoderma*. En fait, la première partie de ce travail de recherche a porté sur la mise en évidence des activités hydrolases chez ces souches fongiques identifiées. Ensuite, le test d'activité antibactérienne sur le développement de la bactérie test : *E. coli*. Par la suite, le test d'activités de l'antagonisme direct (moisissures-moisissures) des 4 genres étudiés. Ce qui en résulte que parmi les quatre différentes activités enzymatiques testées (l'amylase, la caséinase, la gélatinase et la cellulase), les souches étudiées ont montré au moins une activité enzymatique. Le deuxième test a révélé que *Aspergillus niger* et *Aspergillus flavus* ont manifesté un effet antibactérien considérable. Par ailleurs, le test d'antagonisme direct a montré que le genre *Trichoderma* développe une activité antifongique très importante. La dernière étape de ce travail c'est de déterminer la capacité d'une souche fongique à utiliser à différentes températures les déchets de tomate pour la production de la protéase alcaline. Pour ce faire, la souche sélectionnée a étéensemencée dans des milieux de culture solide à base des déchets de tomate à différentes concentrations d'NaCl (1g/l ; 2g /l ; 5g/l et 10g/l), puis incubées aux températures suivantes : à 30°C, à 37°C, et à 53°C. La meilleure activité protéolytique a été notée dans la concentration 10g/l sous la température 30°C. Cette protéase est préalablement thermostable et halophile, car l'emplacement géothermique constituant le site d'isolement (*sebkha d'EL MGHIER*) de la souche favorise le développement d'un système enzymatique assez résistant.

Mots clés : *Sebkha d'EL MGHIER*, Moisissure halophile, Enzyme thermostable, Sol de zone aride, Substance antibactérienne, Activité antifongique.

Laboratoire de recherche : Laboratoire de Microbiologie (RDC). Faculté des Sciences de la Nature et de Vie. Université des Frères Mentouri Constantine 1.

Jury d'évaluation :

Présidente du jury :	Melle. ABDELAZIZ W.	M. C. - UFM Constantine.
Promotrice :	Melle. BELMESSIKH A.	M. A. - UFM Constantine.
Examinatrice :	Melle. MEZIANI M.	M. A. - UFM Constantine.

Date de soutenance : 14/07/2019

