



Université Mohamed Khider de Biskra
Faculté des sciences exactes et sciences de la nature et de
la vie
Département des sciences de la nature et de la vie

MÉMOIRE DE MASTER

Domaine : Sciences de la nature et de la vie
Filière : Sciences biologiques
Spécialité : Microbiologie appliquée

Réf. :

Présenté et soutenu par :
Saliha AMEUR

Le : mercredi 10 juillet 2019

Thème **Profil des enzymes hydrolytiques des** **champignons filamenteux isolés des milieux** **extrêmes (Chott Melghir)**

Jury :

M.	Nasser BELOUCIF	MAA	Université de Biskra	Président
Mme.	Wassila DENDOUGA	MCB	Université de Biskra	Rapporteur
Mme.	Fatiha BENGUERAICHI	MAB	Université de Biskra	Examineur

Année universitaire : 2018/2019

Remerciement

Avant toute chose, nous tenons à remercier « Allah » qui nous a données la force et la volonté

pour terminer ce travail.

Nos profonds remerciements et notre gratitude s'adressent à notre encadreur Mme DENDOUGA Wassila pour sa précieuse aide, ses orientations et le temps qu'elle nous a accordé pour notre encadrement.

Nous tenons aussi à présenter nos vifs remerciements et notre respect au jury pour l'honneur

qu'il nous a fait en acceptant de juger ce mémoire

BELOUCIF Nasser en tant que président du jury.

BENGUERAICHI Fatiha en tant qu'examineur.

Nous remercions également l'ensemble du personnel du laboratoire de la faculté de la biologie et l'agronomie et aussi les personnels de la bibliothèque.

A toutes les personnes qui de près et de loin m'ont apportée leur aide.

Dédicace

Je dédie ce travail

*Au meilleur papa du monde, l'homme qui s'est sacrifié pour
me voir réussir dans ma vie, et pour me rendre heureuse, que Dieu le
garde dans son vaste paradis*

*A ma vie et la source de mon bonheur « ma mère », qui m'a guidé vers le bon chemin, et
qui a*

fait le possible pour me voir réalisé mes rêves.

*Aux personnes qui m'ont énormément aidée et encouragée : Mes très
chers frères «» et Mes chers sœurs «»,
que Dieu les garde et les protège.*

A ma grande mère et mon grand père

A ma tout famille

A mes chères amies: Haizia, Roumaïssa, Fatima, Amel, Ibtissem,

Salîha

Table de matière

Liste des tableaux	I
Liste des figures	II
Introduction	1

Synthèse bibliographique

Chapitre 1 : Les champignons extrémophiles

I. Milieux extrêmes	2
I.1. Généralités	2
I.1.1. Environnements hypersalins	2
I.1.2. Environnements à hautes températures	2
I.1.3. Environnements à pH acide et a pH alcalin	3
II. Champignons filamenteux	3
1. Généralité	3
2. Caractéristique structurale	3
3. Classification	4
4. Mode de vie des champignons filamenteux	4
4.1. champignons saprophyte	4
4.2. champignons parasites	4
4.3. champignons symbiotiques	5
5. Condition de croissance	5
5.1. Eléments nutritifs	5
5.2. Facteurs physicochimiques	5
6. Mode de reproduction des champignons filamenteux	5
6.1. Reproduction asexuée	5
6.2. Reproduction sexuées	5
7. champignons extrémophiles	5
7.1. Champignons halophiles	5
7.2. Champignons thermophiles	6
7.3. Champignons acidophiles et alcalophiles	6

Chapitre 2 : Les enzymes extrémophiles

1. Définition des enzymes	7
1.1. Hydrolases	7
2. Domaines d'application des enzymes fongique	7

2.1. Les protéases	7
2.2. Amylases	7
2.3. Cellulases	8
2.4. Lipases.....	8
2.5. Pectinases	9

Deuxième partie : Partie expérimentale

Chapitre 3 : Matériel et méthodes

1. Présentation de la région d'étude	10
2. Echantillonnage	10
3. Analyses physico-chimiques du sol.....	11
3.1. Mesure du pH du sol.....	11
3.2. Conductivité électrique.....	11
3.3. Détermination du taux d'humidité.....	11
3.4. Dosage des chlorures.....	12
3.5. Mesure du carbone et matière organique.....	12
4. Isolement des champignons filamenteux.....	12
4.1. Préparation du milieu de PDA.....	12
4.2. Préparation de la suspension du sol.....	13
4.3. Ensemencement	13
4.4. Purification.....	13
4.5. Identification.....	13
4.5.1. Identification macroscopique.....	13
4.5.2. Identification microscopique.....	13
4.5.3. Caractérisation physiologique.....	14
5. Mise en évidence de l'activité enzymatique.....	14
5.1. Activité amylolytique.....	14
5.2. Activité cellulolytique.....	14
5.3. Activité pectinolytique.....	14
5.4. Activité protéolytique.....	14
5.5. Activité lipolytique.....	15

Chapitre 4. Résultats et discussion

1. Analyse physicochimiques échantillon du sol collectés de Chott Melghir.....	16
2. Isolement des champignons filamenteux.....	17
3. Identification.....	18
3.1. Identification macroscopique.....	18

3.2. Identification microscopique.....	21
3.3. Test de tolérance à la salinité.....	24
4. Mise en évidence de l'activité enzymatique.....	25
4.1. Activité amylolitique.....	25
4.2. Activité cellulitique.....	26
5. Activité protéolytique.....	28
5.1. Caséinase.....	28
5.2. Gélatinase.....	29
6. Lipase.....	30
Conclusion.....	31
Références bibliographie.....	32
Annexes	

Liste des tableaux

Tableau 1 . Exemple des enzymes produites par les champignons filamenteux	9
Tableau 2 . Analyse physicochimique des échantillons du sol	16
Tableau 3 . Observations quotidiennes de l'ensemencement des différentes dilutions du sol de Chott Melghir sur le PDA	17
Tableau 4 . Aspects macroscopiques des isolats de champignon filamenteux isolé à partir de Chott Melghir sur le PDA	18
Tableau 5 . Aspect microscopiques des isolats des champignons filamenteux . Erreur ! Signet non défini.	
Tableau 6 . Test de tolérance à la salinité	24

Liste des figures

Figure 1 . A : Localisation géographique de régions d'étude .B : Chott Melghir (photo originale)	10
Figure 2. Différentes étapes d'échantillonnage	11
Figure 3. Mise en évidence de l'activité amylolytique	25
Figure 1. Diamètre de la zone d'hydrolyse d'amidon en mm	26
Figure 5. Mise en évidence de l'activité cellulolytique	
Figure 6. Diamètre de la zone d'hydrolyse CMC en mm	Erreur ! Signet non défini.
Figure 7.Mise en évidence de l'activité pectinolytique	27
Figure 8. Diamètre de la zone de lyse de pectine en mm	Erreur ! Signet non défini.
Figure 9. Mise en évidence de l'activité protéolytique sur GL à 30 %	
Figure 10. Diamètre de la zone de lyse de caséine en mm.....	28
Figure 11. Mise en évidence de l'activité de l'activité protéolytique sur milieu gélatiné.	
Figure 12. Diamètre de la zone de lyse de gélatine en mm.	
Figure 13. Mise en évidence de l'activité lipolytique	

Liste des abréviations

PH : poids humide.

PS : poids sec

H : humidité

n : volume de nitrate d'argent (AgNO_3) mesuré après titrage.

n' : volume de nitrate d'argent (AgNO_3) prendre pour le titrage.

V : volume de filtrat.

v : volume d'échantillon.

P : poids du sol

CO : carbone organique.

MO : matière organique

B : le volume de la solution consommée.

A : le volume de la solution consommé par le témoin.

Introduction

Introduction

Les microorganismes sont qualifiés aujourd'hui d'être des participants majeurs dans plusieurs industries à savoir l'industrie pharmaceutique, alimentaire et chimique (Bernard, 1997).

Parmi ces microorganismes, les moisissures ou les champignons filamenteux peuvent représenter des acteurs importants de ce monde vivant. Ils disposent de possibilité d'applications biotechnologiques très étendues, dû à leur capacité à conquérir des substrats naturels grâce à une dissémination efficace, une croissance rapide et un arsenal enzymatique très développé (Leveau et Bouix, 1993).

Actuellement, les champignons filamenteux sont de plus en plus exploitées dans des différents domaines, il sont utilisées dans la production de métabolites en particulier les enzymes (Scriban, 1999).

Pour répondre à l'exigence industrielle aux enzymes surtout les extrémophiles, le sol constitue un bon environnement pour la prolifération fongique, dans lequel, ces microorganismes représentent la biomasse majoritaire de cet écosystème (Calvet, 2000).

La caractérisation d'enzymes d'intérêt industriel constitue une des étapes essentielles de leur exploitation biotechnologique. En effet, les champignons filamenteux présentent une source importante d'enzymes hydrolytiques, plusieurs enzymes d'origine fongiques sont produites à l'échelle industrielle parmi lesquelles les amylases, cellulases, pectinases, et protéases (Saidane *et al.*, 2001).

Dans ce contexte la présente étude est effectuée, dont notre objectif principale est d'étudier l'abondance et la biodiversité des champignons filamenteux de chott melghir ; choisi comme milieu extrême, et d'une part ; de tester leur production en enzymes hydrolytiques pour une éventuelle application biotechnologique (peuvent servir à l'éclaircissement de leur adaptation aux milieux extrêmes) pour cela notre travail pratique est organisé en quatre étapes

1. Analyses physico-chimiques des différents échantillons collectes du sol environnant Chott Melghir ;
2. Isolement et identification morphologique des champignons filamenteux ;
3. Caractérisation physiologique des isolats vis-à-vis la salinité
4. Mise en évidence de cinq activités hydrolytiques de chaque isolat sur milieu solide.

Synthèse bibliographique

Chapitre 1
Les champignons
extrémophiles

I. Milieux extrêmes

I.1. Généralités

Les formes de vie sur terre sont innombrables, comme les environnements qui les abritent. Jusqu'au 20^{ème} siècle, on pensait que la vie n'était possible que dans un environnement «normal», c'est-à-dire là où les conditions sont compatibles avec la vie de l'homme. Puis, les chercheurs ont commencé à trouver des organismes qui survivent dans des conditions hors de ces normes, dans des milieux caractérisés par des conditions physiques et/ou chimiques extrêmes de température, de pH, de pression, où l'oxygène est rare et la composition chimique de l'environnement proche est toxique (Peduzzi et *al.*, 2006).

Ces êtres exceptionnels qui défient les lois de la biologie et créent la vie ou l'homme n'osait l'imaginer sont qualifiées d'extrémophiles (Echigo et *al.*, 2005), et ils ne sont pas seulement tolérants à ces conditions extrêmes mais celles-ci sont requises pour leur croissance et développement (Pikuta et Hoover, 2007).

Comme tous ces environnements il y a le sol qui est un milieu fragile et très longtemps considéré comme un simple support de l'agriculture (Calvet, 2000), a des nombreuses fonctions dans et sur lequel se développent des organismes vivants (Les bactéries et les champignons constituent les microorganismes les plus représentatifs des sols) (Quenea, 2004).

Les environnements réunissant des conditions physico-chimiques hostiles à la vie sont très nombreux sur la planète (Irwin et Baird, 2004), Il en existe différents groupes de milieux extrêmes sur terre où la survie de l'Homme se trouverait menacée (Cavicchioli *et al.*, 2011), tous sont répartis en fonction des paramètres physiques (pression, température...) ou chimiques comme l'acidité, la salinité ..., le pH et la salinité interagissent très fortement dans un biotope extrême (Kristjansson et Hreggvidsson, 1995).

I.1.1. Environnements hypersalins

On considère qu'un environnement est hypersalin quand la concentration en sels est supérieure à celle de l'eau de mer, qui est d'environ 35 g/L (Dassarma et Dassarma, 2012).

I.1.2. Environnements à hautes températures

La température est une variable importante dans chaque écosystème. La vie aux températures élevées est classée en forme thermophile ou hyperthermophiles entre 45°C et 80°C (Madigane et Martino, 2006).

I.1.3. Environnements à pH acide et à pH alcalin

Les environnements acides sont particulièrement intéressants car, en général, le faible pH de l'habitat est la conséquence du métabolisme des microorganismes qui se développent de façon optimale à un pH de 2, et les environnements alcalins caractérisés par un pH 10 (Morozkina *et al.*, 2010).

II. Champignons filamenteux

1. Généralité

Les champignons sont des êtres eucaryotes, hétérotrophes, filamenteux (Botton *et al.*, 1990).

Les moisissures peuvent être définies comme des microorganismes filamenteux et immobiles, dont la structure cellulaire est celle d'une cellule eucaryote classique (Nicklin *et al.*, 2000). Ils sont dépourvus de chlorophylle (Genevès, 1990; Genevès, 1992).

Les champignons appartiennent à l'embranchement des thallophytes, leur appareil végétatif ou thalle ne comporte pas de système conducteur différencié. L'appareil végétatif des champignons (thalle) est généralement constitué par un mycélium formé de filaments tubulaires cylindriques ramifiés, à croissance linéaire apicale, dont le diamètre varie selon les espèces de 1 à 2 μm jusqu'à plus de 50 μm (Semal *et al.*, 1993).

Chez la plupart des moisissures, les hyphes sont divisés par les cloisons ou septa (septum singuliers) ou les appelle alors hyphes segmentés ou septés, dans quelques classes de mycètes, les hyphes ne contiennent pas de cloisons et ont l'aspect de longues cellules continues à noyaux multiples; ils sont appelés cénocytes (Tortora *et al.*, 2003).

Les champignons filamenteux possèdent d'extraordinaires possibilités d'adaptation. Elles peuvent exploiter rapidement toute changement favorable à la survie de l'espèce en condition difficiles (Bourgois et Larpent, 1996), et possèdent une panoplie enzymatique extrêmement riche (cellulolytiques, pectinolytiques, protéolytiques...), qui leur permet d'utiliser plusieurs substrats comme source de carbone et d'énergie (Meyer *et al.*, 2004).

2. Caractéristique structurale

- **Paroi:** Les composants caractéristiques de la paroi sont principalement la chitine et des glucanes (Griffin, 1994).
- **Noyau:** peuvent contenir un, deux ou plusieurs noyaux.
- **Mitochondries:** existent dans le cytoplasme, circulaire, ovale ou allongées. Leur taille, forme et nombre varient durant le cycle de la cellule et en réponse aux conditions environnementales.

- **Membrane plasmique:** (ou plasmalemma) similaire à celle des autres eucaryotes, consistant en une bicouche de phospholipides et des protéines et stérols associés (Nasraoui, 2006)
- **Thalle :** Le corps ou thalle d'une moisissure composé de deux parties; le mycélium et les spores. Le mycélium est un ensemble de plusieurs filaments appelés hyphes ; chaque hyphe mesure 5 à 10 µm de diamètre possède un cytoplasme commun (Ait Abdelouahab, 2001).

3. Classification

La classification des espèces appartenant au règne de « *Fungi* » a connu de nombreuses modifications. A l'heure actuelle, la classification des champignons s'est considérablement simplifiée et le règne fongique est divisé en quatre phylum définies par le caractère cloisonné ou non du thalle, la présence ou l'absence de gamètes ou de spores mobiles et les caractères morphologiques des organes différenciés de la reproduction sexuée (Sylvie, 2015). On reconnaît quatre classes de champignons

- ❖ **Phycomycètes :** C'est un groupe tellement hétérogène que les taxonomistes le divisent en six sous classes séparées. Ils sont typiquement cénocytiques.
- ❖ **Ascomycètes :** les mycètes parfaits dont le mycélium est bien développé et cloisonné qui porte des spores (ascospores).
- ❖ **Basidiomycètes :** mycètes parfaits, qui se distinguent par la production de basidiospores externes à l'extrémité ou sur le côté d'une baside.
- ❖ **Deutéromycètes :** regroupent temporairement les mycètes imparfaits jusqu'à ce qu'on découvre leur phase sexuée.

4. Mode de vie des champignons filamenteux

La grande majorité des champignons sont saprophyte (proliférant sur de la matière inerte) (Hibbett *et al.*, 2007 ;Bourgeois,1996),et capables de se propager dans différents environnements grâce a leurs aptitudes métaboliques étendues,on peut distinguer selon leur mode de vie :

4.1. Champignons saprophyte : les espèces saprophytes se développent aux dépend des substances mortes d'origines animale ou végétale (Bouchet *et al.*, 1999), elles jouent un rôle essentiel au sein des cycles biologiques en minéralisant les matières végétales ou animales mortes (Marouf et Reynaud, 2007).

4.2. Champignons parasites : vivent a des substances organiques; Le parasitisme est généralement nuisible et souvent nocif (Florent, 1993) (Bouchet *et al* ; 1999).

4.3. Champignons symbiotique: la symbiose se définit comme une association étroite entre les organismes d'espèces différentes, vivant en équilibre les uns avec les autres mais pouvant vivre séparément (Raven *et al.*, (2000) ; Marouf et Reynaud (2007)).

5. Condition de croissance

5.1. Eléments nutritifs

Les champignons exigent la présence des éléments nutritifs de base (carbone, azote et ions minéraux) dans le milieu qui assure leur croissance (Davet, 1996), et ils exigent la présence des ions minéraux et métaux dans le milieu de culture nécessaire pour la croissance et la reproduction des espèces fongiques, il s'agit essentiellement de sulfate, de magnésium, de potassium, de sodium et de phosphore avec des concentrations plus au moins différentes selon l'espèce (Uchicoba *et al.*, 2001).

5.2. Facteurs physicochimiques

La température joue un rôle prépondérant dans la croissance mycélienne, elle intervient également dans la sporulation et la germination des spores (Bourgeois, 1989), les champignons filamenteux ont un faible besoin en eau par rapport à d'autres microorganismes ($a_w = 0.65$) (Boiron, 1996), et un pH dans une zone de 4.5 – 6 (Botton *et al.*, 1999) .

6. Mode de reproduction des champignons filamenteux

6.1. Reproduction asexuée : Les spores représentent le mode de reproduction asexué plus commun chez les champignons : elles sont produites soit dans des sporanges, soit à partir de cellules d'hyphes appelées cellules conidiogènes (Raven *et al.*, 2000).

6.2. Reproduction sexuée : Elle est assurée par des gamètes ou des spores formées 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).

7. Champignons extrêmophiles

sont des microorganismes qui se développent de manière optimale dans des conditions mortelle pour la quasi-totalité des autres espèces (Querellou et Guezennec ,2010).

7.1. Champignons halophiles

Les halophiles vivent dans les environnements hypersalins et exigent dans beaucoup de cas la salinité pour survivre (Dassarma, 2001), La distribution des moisissures dans ces environnements dépend du phosphore, de l'azote, de l'oxygène dissous, de l'activité de l'eau et du pH (Gunde-Cimerman *et al.*, 2009).

7.2. Champignons thermophiles

La température est une variable importante dans chaque écosystème. La vie aux températures élevées est classée en forme thermophile ou hyperthermophile. Les thermophiles sont des microorganismes qui se développent à des températures relativement élevées, entre 45°C et 80°C. Les hyperthermophiles sont des thermophiles particulièrement extrêmes pour lesquelles les températures optimales sont au-dessus de 80°C (Madigan et Martino, 2006).

7.3. Champignons acidophiles et alcalophiles

Les alcalophiles sont des microorganismes qui se développent de façon optimale à pH supérieur à 9,0, souvent avec un pH optimum autour de 10, (Horikoshi, 1999). Une diversité de microorganismes peut croître à pH de 10,5 (Martins *et al.*, 2001) , et les acidophiles se développent de façon optimale à un pH de 2 (Morozkina *et al.*, 2010).

Chapitre 2
Les enzymes
extrêmophiles

1. Définition des enzymes

Les enzymes sont des protéines stables et solubles en phase aqueuse, elles possèdent des propriétés remarquables présentées par leur spécificité et leur régulation (Jacques, 2000).elles sont présentes dans tous les organismes vivants. Et contrôlent les processus métaboliques (Serge et Pierre, 2004) en augmentant la vitesse des réactions de 10^8 à 10^{12} fois, (Voet et Voet, 2005).

Une demande de plus en plus croissante est remarquée en biocatalyseurs stables, utilisables en biotechnologie moderne. les extrémophiles jouent un rôle important dans les industries de produits chimiques, alimentaires, pharmaceutiques, de papier et de textiles et aussi en biotechnologie environnementale (Horvath et Horvath, 2002).

1.1. Hydrolases

Les enzymes hydrolytiques des organismes halophiles ont été abordés par Nordberg et Hofsten en 1969. Leur propriétés ont fait ces enzymes d'excellents candidats pour différentes applications biotechnologiques dans de nombreux processus industriels (Setati, 2010). Les enzymes produites par les organismes thermophile sont extrêmement thermoactives, rigoureusement thermostables, ayant même des activités à des températures dépassant les températures maximales de croissance de leurs organismes. Elles résistent souvent aux dénaturants chimiques et les valeurs extrêmes de pH (Antranikian *et al.*, 2005).

2. Domaines d'application des enzymes fongique

2.1. Les protéases

Les protéases sont des enzymes qui catalysent l'hydrolyse des protéines dans des sites bien spécifiques en scindant la liaison peptidique qui lie deux acides aminés dans une chaîne peptidique (Kumar *et al.*, 2008).

Les moisissures présentent une source importante de protéase d'intérêts industriels (Ashok, 2006).Ont été longtemps utilisées pour produire des aliments ainsi que des aromates (Larreta-Garde, 1997). Actuellement, elles sont utilisées dans trois principaux domaines: les produits de boulangerie, la production et la maturation des fromages (Bauchart et Picard, 2010) (Neklyudov *et al.*, 2000). Les protéases sont utilisées aussi dans les détergents pour éliminer les taches protéiques (Rao *et al.*, 1998), ainsi que dans le domaine de la gestion des déchets domestiques (Anwar et Saleemuddin, 1998).

2.2. α - amylases

L' α -amylase est une endoenzyme appartenant à la famille des hydrolases (Franco *et al.*, 2000).Elle catalysant le clivage des liaisons glycosidiques de type (1-4) dans l'amidon et du

glycogène, donnant des produits à bas poids moléculaire. Elle provoque la libération du glucose, du maltose et surtout d' α -dextrines (Souza, 2010).

Les amylases ont une gamme étendue d'applications dans beaucoup de champs tels que les industries de la saccharification d'amidon, des aliments, de boulangerie et l'industrie du textile (Gupta *et al.*, 2003).

Dans le domaine alimentaire, on peut citer l'utilisation de l'amylase gardant la fraîcheur du pain et des gâteaux et son utilisation dans la production efficace de la bière (Simon et Barry, 2005).

2.3. Cellulases

Les cellulases se rapportent à un groupe d'enzymes qui agissant ensemble, hydrolysent la cellulose en sucres simples (Korish, 2003). C'est un système enzymatique complexe, composé de trois types principaux d'enzymes: Endo β (1-4)-glucanase ou endocellulase, Exo β (1-4)-glucanase ou cellobiohydrolase, β (1-4)-glucosidase ou cellobiase (Wang *et al.*, 2002).

Actuellement la biotechnologie des cellulases occupe environ 20 % du marché mondial des enzymes (Bhat, 2000; Lekchiri *et al.*, 2006). Les cellulases produites par les champignons filamenteux présentent plusieurs intérêts

En industrie agro-alimentaire les cellulases sont utilisées pour faciliter la filtration des diverses suspensions riches en fibres cellulosiques manipulées par ce type d'industrie (Scriban, 1993).

Les cellulases sont employées dans l'industrie du textile pour donner l'aspect aux vêtements en jean après lavage (Gusakov *et al.*, 2000), aussi bien que dans les détergents de blanchisserie pour ramollir les tissus (Aygan et Arıkan, 2008). L'addition de cellulases aux suspensions de pâtes (en cours de lavage) ou en suspension de pâtes de papiers de recyclage, améliore significativement leur filtrabilité et conduit à des économies importantes de consommation d'eau (Scriban, 1999).

2.4. Lipases

Les lipases caractérisées par leur stabilité et leur activité dans les solvants organiques sont des biocatalyseurs importants, particulièrement adaptés pour des applications industrielles (Schmidt *et al.*, 2004).

Elles sont utilisées pour le développement de saveur pour les produits laitiers (fromage, beurre, margarine, boissons alcooliques, chocolat du lait et bonbons) (Najjar, 2010) et elles interviennent dans la maturation des fromages (Hasan *et al.*, 2006)

Leur utilisation dans les détergents (Lessives ménagères) est le champ d'application le plus important des lipases (Jaeger et Reetz, 1998). Les lipases sont largement mises en oeuvre dans l'industrie pharmaceutique pour la synthèse des Médicaments (Jaeger et Eggert, 2002).

2.5. Pectinases

Les enzymes pectinolytiques « pectinases » constituent un groupe unique, complexe et hétérogène de différentes enzymes agissant spécifiquement sur les substrats pectinolytiques, notamment les polymères de pectine, (Tatiana et Flevo, 2005).

Elles sont essentiellement d'origine microbienne. Les pectinases sont utilisées plus particulièrement en industrie agro-alimentaire (industrie des jus de fruit et industrie oléicole) (Lang et Dornenburg, 2000), ces enzymes sont utilisées dans la dégradation des macromolécules pectiques qui restent en suspension à la suite de pressage de fruits (Thibault et Petit, 1979; Larpent-Gourgau et Sangler, 1992), aussi en industrie du textile et du papier (Lang et Dornenburg, 2000)

Tableau 1. Exemple des enzymes produites par les champignons filamenteux

Enzymes	Micro-organismes	Références
protéases	<i>Aspergillus niger</i> <i>Fusarium sp</i> <i>Endothia parasitica</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Vierling, 2008 Kitano <i>et al.</i> , 1992 Branger <i>et al.</i> , 2007 Mahanta <i>et al.</i> , 2008
Amylases	<i>Penicillium</i>	Kikani et Singh, 2011
Cellulases	<i>Aspergillus</i> <i>Trichoderma</i>	Kuhad <i>et al.</i> , 2011 Kuhad <i>et al.</i> , 2011
Lipases	<i>Fusarium</i> <i>Alternaria</i>	Gao <i>et al.</i> , 2000 Prazeres <i>et al.</i> , 2006
Pectinases	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> <i>Aspergillus</i>	Saloua Saidane Hoondal <i>et al.</i> , 2002

Partie expérimentale

Chapitre 3

Matériel et méthodes

1. Présentation de la région d'étude

Chott Melghir ($34^{\circ}15'N$, $06^{\circ}17'E$) est le plus grand lac salé d'Algérie, ce Chott se situe au nord-est du Sahara septentrional couvrant de grandes superficies de 551500 à 337700 ha. L'altitude de ce Chott est considérée comme la plus basse du nord d'Afrique, il atteint dans certains endroits 31 m au-dessous du niveau de la mer.

Se constitue une vaste bande qui s'étale du sud tunisien jusqu'au mont de l'Atlas au nord Algérien, l'évaporation de l'eau du Chott surtout en saison sèche donne naissance à des cristaux de sel composés essentiellement du chlorure de sodium (Remli et Bounouala, 2016).

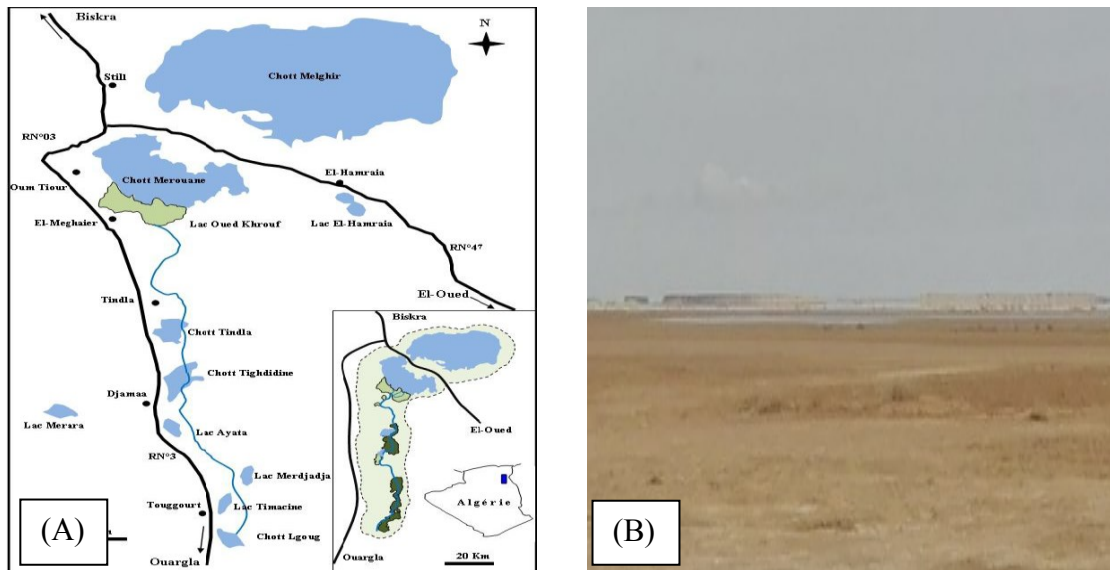


Figure 1 . A : Localisation géographique de régions d'étude .B : Chott Melghir (photo originale)

2. Echantillonnage

Les échantillons sont prélevés du sol entourant Chott Melghir ; le prélèvement a été réalisé le 23/01/2019 dans des conditions d'asepsie, après l'écartement des 5 premiers centimètres de la couche superficielle du sol ; neuf échantillons sont prélevés à l'aide d'une grande spatule stérile d'une profondeur de 10 centimètres.

Le sol a été récupéré dans des flacons stériles soigneusement fermés puis conservés aux laboratoires à $4^{\circ}C$ pour les analyses physicochimiques et mycologiques (Voire figure 02)



Figure 2. Différentes étapes d'échantillonnage

3. Analyses physico-chimiques du sol

3.1. Mesure du pH du sol

Les mesures du pH des échantillons du sol nécessitent au début la préparation d'une suspension du sol (20g du sol avec 100 ml d'eau distillée). Une agitation pendant 45 min a permis l'obtention d'une suspension homogène, la valeur de pH est déterminée par un pH mètre (Aubert, 1978).

3.2. Conductivité électrique

Dans un bécher de 100 ml peser 10g de sol et ajouter 100 ml d'eau distillée et agiter pendant 1h, avec un agitateur magnétique puis laisser reposer 15min et après filtration mesurer la CE à l'aide d'un conductimètre (Aubert, 1978).

3.3. Détermination du taux d'humidité

La méthode consiste à sécher 1g du sol pendant 2 jours dans un dessiccateur à 105°C, jusqu'à l'obtention d'un poids constant (Denis, 1988). Le pourcentage d'humidité est calculé selon la formule suivante:

$$H = \left[\frac{(PH-PS)}{PH} \right] \times 100$$

H : humidité

PH: poids humide

PS: poids sec

3.4. Dosage des chlorures

Selon Aubert (1978) la méthode consiste à diluer 10 g de sol dans 50 ml d'eau distillée, après une filtration 5 ml de filtrat et rajouter 3 goutte de bichromate de potassium (K_2CrO_4) avec une agitation jusqu'à l'obtention d'une couleur verte. Le titrage est effectuée par le nitrate d'argent ($AgNO_3$) à 0.1 N jusqu'à l'obtention d'une couleur rouge brique et prendre le volume (n). le témoin est préparé en remplaçant prendre le filtrat par l'eau distillée. La concentration du chlore est déterminée selon la formule suivante:

$$Cl \text{ mg/l} = [(n-n') 0,1 V/v]. 100/p$$

n : volume de nitrate d'argent ($AgNO_3$) mesuré après titrage.

n' : volume de nitrate d'argent ($AgNO_3$) prendre pour le titrage.

V : volume de filtrat.

v : volume d'échantillon.

p : poids du sol 1 g.

3.5. Mesure du carbone et matière organique

Le carbone organique est dosée selon la méthode de Anne, il est oxydé par le bichromate de potassium en milieu sulfurique, Le bichromate doit être en excès, et titré par une solution de sel de Mohr, en présence de diphénylamine dont la couleur passe du bleu foncé au bleu vert (Mathieu, 2003) (Annexe1). Le témoin est préparé en remplaçant prendre le filtrat par l'eau distillée.

$$CO (\%) = 3 (A-B)/A$$

$$MO (\%) = (A-B)/A. 6,896$$

- Soit **B** le volume de la solution consommée.

- Soit **A** le volume de la solution consommé par le témoin.

4. Isolement des champignons filamenteux

4.1. Préparation du milieu de PDA

Dans notre travail, nous avons utilisé le PDA (Gélose à l'extrait de pomme de terre; voir l'annexe 02). Qu'est un milieu usuel pour la culture de la plupart des champignons.

Le milieu est additionné de 50 ppm gentamicine afin d'inhiber la croissance des bactérienne (Botton *et al.*, 1990).

4.2. Préparation de la suspension du sol

Une quantité de 10 g du sol est suspendue dans 90 ml d'eau distillée stérile. Le mélange est agité pendant 30 minutes afin d'homogénéiser la solution qui sert à préparer une série de dilutions décimales (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}) (Almi, 2016).

4.3. Ensemencement

Un volume de 1 mL de chaque dilution est déposé dans une boîte de Pétri contenant préalablement le PDA. Les boîtes sont homogénéisées, par agitation manuelle de manière circulaire, sur un plan horizontal. Les boîtes sont incubées à 25-30°C pendant sept jours (Almi, 2016).

4.4. Purification

La purification concerne principalement les colonies dont les caractères cultureux sont différents. Il s'agit donc de prélever quelques spores ou une petite bouture mycélienne à la marge du thalle et de l'ensemencer de manière aseptique dans des boîtes de Pétri contenant le PDA. Afin d'obtenir un développement typique du champignon, l'inoculation est réalisée en un seul point au centre de la boîte (Almi, 2016).

4.5. Identification

L'identification des moisissures fait essentiellement appel aux caractères cultureux (identification macroscopique) et à la morphologie (identification microscopique), rarement à des propriétés biochimiques (Dendouga, 2006).

4.5.1. Identification macroscopique

L'examen macroscopique des nos isolats permet de déterminer les caractères cultureux suivants : la vitesse de croissance, le diamètre de la colonie, sa texture, la couleur du thalle, la couleur du revers ainsi que son odeur (Almi, 2016).

4.5.2. Identification microscopique

Nos isolats de moisissures ont soumis à une identification e réalisée également par une étude microscopique. Cette dernière a été effectuée par la méthode de drapeau qui consiste à prendre un petit morceau de scotch est l'appliqué sur la surface de la culture fongique à examiner. Ce morceau du scotch est ensuite appliqué sur une lame qui contient une goutte de lactophénol (annexe2). Des observations microscopiques ont été effectuées par microscope optique a grossissements ($\times 400$) Cet examen a permis d'étudier les filaments, les spores (Guezlane-Tebibel *et al.*, 2008).

4.5.3. Caractérisation physiologique

La tolérance des isolats à la salinité est testée dans des boîtes de Pétri contenant le milieu PDA ajouté de concentrations progressives de NaCl : 10 %, 17.5 %. Chaque isolat est incubé 7 j (Guiraud, 2003).

5. Mise en évidence de l'activité enzymatique

5.1. Activité amylolytique

La capacité à dégrader l'amidon a été utilisée comme critère de détermination de la capacité à produire des enzymes amylolytiques. Après 3 à 5 jours d'incubation, les boîtes pétri ont été inondées avec une solution d'iode (annexe 4) et une zone jaune autour d'une colonie indique une activité amylolytique (hankin et Anagnostakis ,1975).

5.2. Activité cellulolytique

Le milieu de base supplémenté par 0,5% (p/v) de carboxyméthylcellulose (CMC) (annexe 3) est utilisé pour sélectionner les isolats fongiques ayant une activité cellulolytique. Les boîtes sont incubées à 30°C pendant 3 à 7 jours. Après incubation, les boîtes de Pétri sont remplies d'une solution de rouge Congo à 0,1% (p/v) (annexe 4) et placées pendant 15 à 30 min. Les boîtes sont lavées par une solution de NaCl 1M pendant 5 à 10 min à température ambiante avant la lecture. La production de cellulase est appréciée par l'apparition de zones claires autour de la colonie (Benkahoul *et al.*, 2017).

5.3. Activité pectinolytique

Pour détecter l'activité pectinolytique, nous avons utilisé le milieu décrit par Hankin *et al.* (1975) (Annex3) Ce milieu a été utilisé pour détecter la production de pectate lyase, les boîtes ont été incubées pendant 3 à 7 jours puis inondées avec une solution aqueuse de citrate de cuivre (annexe 4) (Malika *et al.*, 2017). Ce réactif précipite la pectine intacte dans le milieu. Par ailleurs, des zones claires autour d'une colonie (hankin et Anagnostakis ,1975).

5.4. Activité protéolytique.

A. caséinase

Un milieu gélosé contenant 30% du lait écrémé (annexe3) est utilisé dans la mise en évidence de la présence d'une activité protéolytique. L'incubation a lieu à 30°C pendant 3 à 7 jours. L'hydrolyse des protéines du lait est indiquée par l'apparition d'une zone claire autour de la colonie (Benkahoul *et al.*, 2017).

B. Gélatinase

Un milieu contenant de la gélatine (annexe3) comme protéine substrat a été utilisée pour détecter la production d'enzymes protéolytiques. Après incubation de 3 à 7 jours, la

dégradation complète de la gélatine était visible avec une zone claire autour des colonies. Si la plaque était ensuite inondée d'une solution aqueuse saturée de sulfate d'ammonium (annexe 4), renforçait les zones claires autour de colonie confirmant la production d'enzyme (hankin et Anagnostakis ,1975)

5.5. Activité lipolytique

Un milieu contenant huile d'olive 2.5% (annexe 3) utilisé comme substrat lipidique pour détecter la production d'enzymes lipolytiques. La formation d'enzymes lipolytiques est apparue soit comme un précipité visible dû à la formation de cristaux du sel de calcium de l'acide laurique libéré par l'enzyme autour d'une colonie en raison de la dégradation complète du sel de l'acide gras (hankin et Anagnostakis ,1975).

Chapitre 4

Résultats et discussion

1. Analyse physicochimique des échantillons du sol collectés de Chott Melghir

Les analyses physicochimiques des différents échantillons du sol collectés de Chott Melghir sont présentées dans le tableau suivant

Tableau 2 . Analyses physicochimiques des échantillons du sol

Echantillons	pH	CE (ms/cm)	H (%)	Cl(mg/l)	C (%)	MO(%)
E1	7.96	35	10	65	0.281	0.646
E2	7.97	27	10			
E3	7.86	26	30			
E4	7.64	24.4	20	68		
E5	7.47	28	30			
E6	7.86	20.6	20	63		
E7	7.78	30.6	10			
E8	8.07	41.5	20			
E9	7.93	67.2	10			

- **pH**

Le pH fait partie d'une des plus importantes caractéristiques physicochimiques des sols. Selon Aubert (1978), on a pu classer nos échantillons, dont le pH est compris entre 7.47 et 8.07 comme des sols alcalins

- **Conductivité électrique**

En se basant sur les résultats de la conductivité électrique présentés dans le tableau précédent et d'après Aubert(1978), on a pu classer nos échantillons, dont la conductivité est comprise entre 24.4 et 67.2 ms/cm pour Chott Melghir, comme des sols très salés. Ce qui représente vraiment un écosystème extrême très salin.

- **Humidité**

L'intervalle d'humidité des différents échantillons du sol analysés varie de 10 à 30, ces taux nous permettent de considérer selon Lee et Hwang (2002) que le sol de Chott Melghir dans la période d'échantillonnage comme à faible teneur en humidité.

- **Dosage des chlorures**

Les résultats présentés dans le tableau 2 montrent que les concentrations en chlorure dans nos échantillons varient entre 63 et 68 mg/l. Ces teneurs importantes reflètent la salinité élevée du sol.

- **Matière organique**

Le taux de matière organique (%) dans un sol est considéré comme; faible (4,0-7,0), d'après Lee et Hwang (2002). Les analyses de la matière organique (MO) de nos échantillons ont permis de montrer des taux très faibles (de l'ordre de 0,646 %).

2. Isolement des champignons filamenteux

L'ensemencement de la suspension du sol et les différentes dilutions sur PDA a permis l'apparition de 16 isolats de champignons filamenteux, le suivi de leur apparition pendant une semaine est enregistré dans le tableau 3.

Tableau 3. Observations quotidiennes de l'ensemencement des différentes dilutions du sol de Chott Melghir sur le PDA.

Echantillons	Dilution	J1	J2	J3	J4	J5	J6	J7	J8	J9	J10
E01	Solution mère	-	+	+	+	++	++	++	++	++	+++
	10 ⁻¹	-	+	+	+	+	+	+	++	++	++
	10 ⁻²	-	+	+	+	+	++	++	++	++	+++
	10 ⁻³	-	-	-	-	+	+	+	+	+	++
E02	Solution mère	-	-	-	-	+	+	+	+	+++	++++
	10 ⁻¹	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	10 ⁻²	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	10 ⁻³	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E03	Solution mère	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
	10 ⁻¹	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
	10 ⁻²	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
	10 ⁻³	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
E04	Solution mère	-	-	-	+	+	+	+	+	++	+++
	10 ⁻¹	-	-	-	-	+	+	+	+	++	+++
	10 ⁻²	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
	10 ⁻³	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
E05	Solution mère	-	+	+	+	+	+	+	+	+	++
	10 ⁻¹	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	10 ⁻²	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	10 ⁻³	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
E06	Solution mère	-	+	+	+	+	+	+	+++	+++	++++
	10 ⁻¹	-	+	+	+	+	+	+	+	++	+++
	10 ⁻²	-	+	+	+	+	+	++	+++	+++	+++
	10 ⁻³	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
E07	Solution mère	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	10 ⁻¹	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	10 ⁻²	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	10 ⁻³	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E08	Solution mère	-	-	-	-	+	+	+	+	++	++++
	10 ⁻¹	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+++
	10 ⁻²	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	10 ⁻³	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E09	Solution mère	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
	10 ⁻¹	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	10 ⁻²	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	10 ⁻³	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+

J : jour, + :10 isolats , ++ : 10-20isolats , +++ : 20-30isolats , ++++ : supérieur à 30

Selon les résultats présentés dans ce tableau, on peut constater que la charge microbienne dans nos échantillons du sol est faible, où la majorité des isolats de moisissures sont apparus de l'ensemencement de la solution mère. Ces résultats confirment les résultats des analyses physicochimiques, dont les milieux extrêmes sont les moins peuplés en microorganismes. En effet, l'abondance des microorganismes dans le sol varie et liée aux variations spatiales et de la quantité des éléments nutritifs, tels que l'azote, la matière organique et l'humidité du sol (Aguilera, 1999).

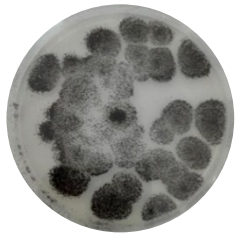
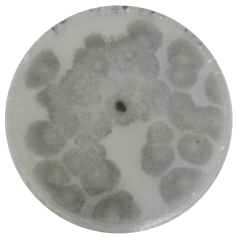
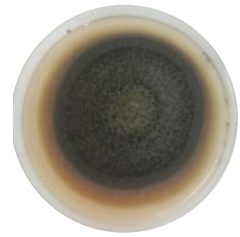



3. Identification





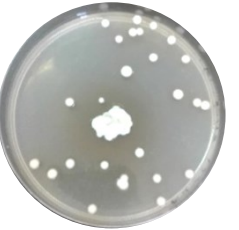

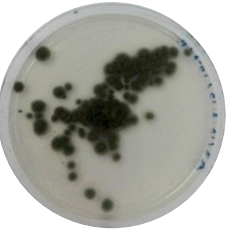
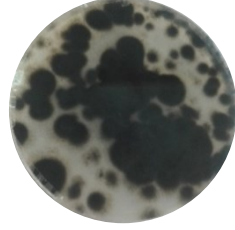
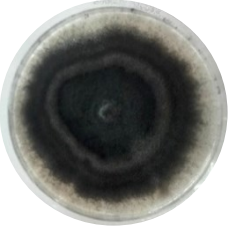
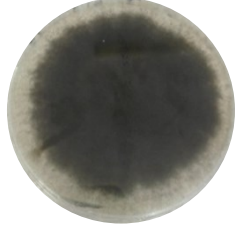
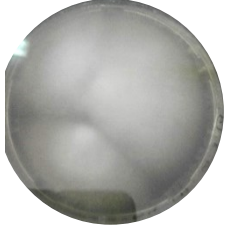

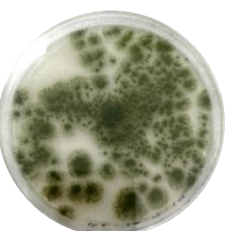
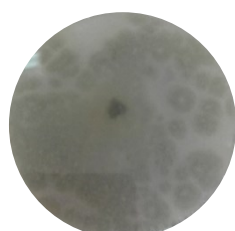
3.1. Identification macroscopique


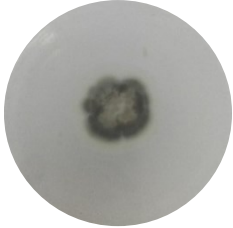
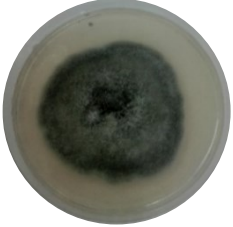
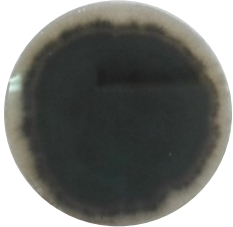

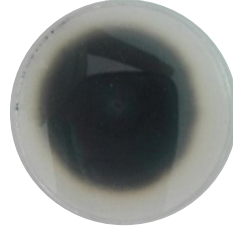




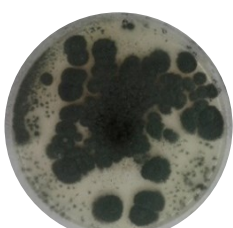
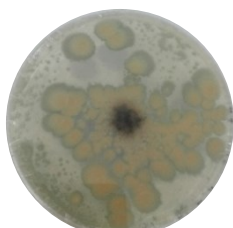
Au total, neuf échantillons de sol ont été examinés pour l'étude de la diversité fongique. Les résultats obtenus au cours des différents isolements réalisés, sont représentés dans le tableau et révèlent la présence de 16 isolats fongiques.

L'étude macroscopique a permis la distinction entre les différentes espèces. On se basant essentiellement sur l'aspect des colonies, leurs couleurs et du revers de la culture ainsi que la présence ou l'absence de pigments caractéristiques de chaque souche.

Tableau 4. Aspects macroscopiques des isolats de champignon filamenteux isolé à partir de Chott Melghir sur le PDA

Numéro et code de l'isolat	Recto	Caractère macroscopiques	Verso
Isolat n° = 01 A4 10-3		Recto : noir Verso : incolore Croissance : très rapide Aspect : Relief de la colonie : colonie bombée.	
Isolat n° = 02 A1 11/2(5)		Recto : noir a bordure marron Verso : noir Croissance : moyenne Aspect : Relief de la colonie : plat	
Isolat n° = 03 A1 17/2(3)		Recto : colonie de couleur marron claire. Verso : crème. Croissance : très lente. Aspect : laineux. Relief de la colonie : colonie plat et ronde.	

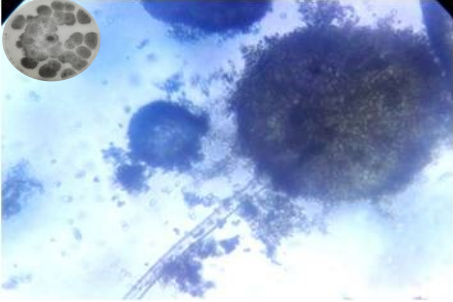

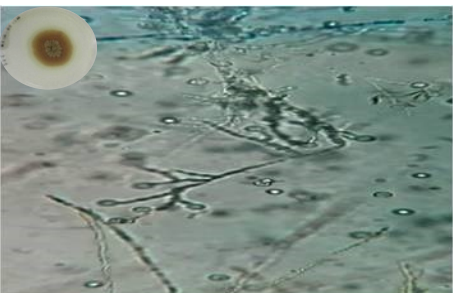

<p>Isolat n° =04 A617/2</p>		<p>Recto : noir Verso : noir Croissance : rapide Aspect : cotonneux Relief de la colonie : colonie bombée.</p>	
<p>Isolat n° =5 A111/2 (1)</p>		<p>Recto : colonies de couleur blanche. Verso : Jaune claire Croissance : très lente Aspect : poudreux. Relief de la colonie : colonie plat</p>	
<p>Isolat n° =6 A4 24/2</p>		<p>Recto : colonie de couleur blanche. Verso : jaune pâle. Croissance : rapide. Aspect : cotonneux Relief de la colonie : colonie bombée.</p>	
<p>Isolat n° =7 A3 19/2</p>		<p>Recto: colonies de couleur verte-noirâtre. Verso : noir Croissance : moyenne à rapide. Aspect : poudreux. Relief de la colonie: colonie avec un centre bombée.</p>	
<p>Isolat n° =8 A5 17/3</p>		<p>Recto : vert Verso : vert pâle Croissance : rapide Aspect :poudreux Relief de la colonie : colonie bombée</p>	
<p>Isolat n° =9 S17/3</p>		<p>Recto : colonie de couleur blanche. Verso : blanche à centre jaune Croissance : rapide Aspect : cotonneux Relief de la colonie : colonie bombée.</p>	
<p>Isolat n° =10 A6 17/2</p>		<p>Recto : colonies de couleur vert herbé Verso : verte jaunâtre. Croissance : moyenne Aspect : poudreux Relief de la colonie : colonie plat et rond.</p>	

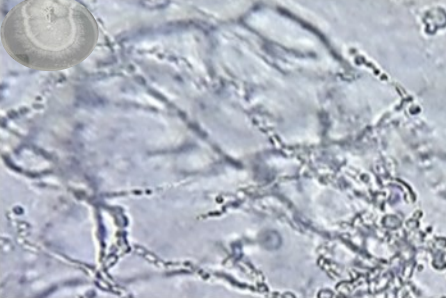
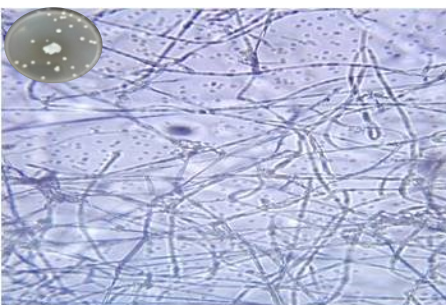
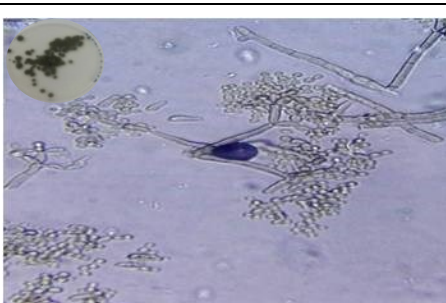
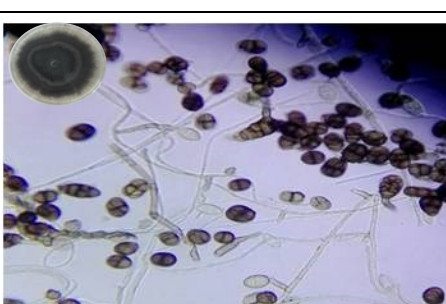
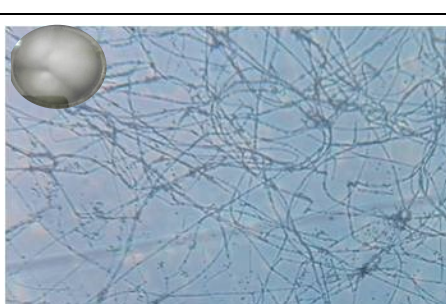
<p>Isolat n° =11 A1 17/2 (4)</p>		<p>Recto : Blanc à centre noir Verso : Bège Croissance :lente Aspect :laineux Relief de la colonie :Bombée</p>	
<p>Isolat n° =12 A6 20/2</p>		<p>Recto : verts olivier Verso :Noire Croissance :Moyenne Aspect :Poudreux Relief de la colonie :Bombée</p>	
<p>Isolat n° =13 A9 11/9</p>		<p>Recto :Gris Verso :Gris Croissance :Lente Aspect :Laineux Relief de la colonie :Plat et ronde</p>	
<p>Isolat n° =14 A1 AS 7/3</p>		<p>Recto : colonie de couleur verte foncé. Verso : vert pale Croissance : rapide Aspect : poudreux. Relief de la colonie : colonie bombée.</p>	
<p>Isolat n° =15 A1 14/2(3)</p>		<p>Recto : blanche a centre jaune Verso : Jaune claire Croissance : lente Aspect :laineux Relief de la colonie :Bombée</p>	
<p>Isolat n° =16 A5 sm 17/2</p>		<p>Recto : colonie de couleur verte foncé. Verso : vert pale Croissance : rapide Aspect : poudreux Relief de la colonie : colonie bombée.</p>	


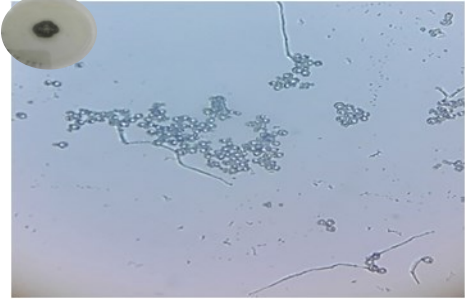
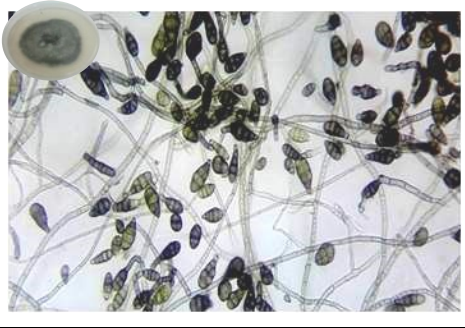
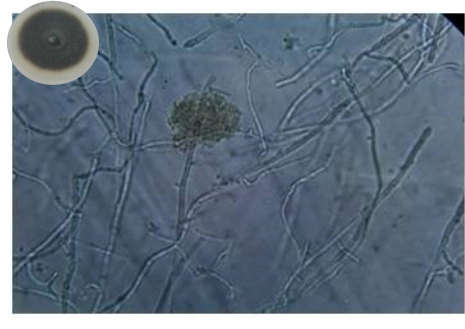

3.2. Identification microscopique

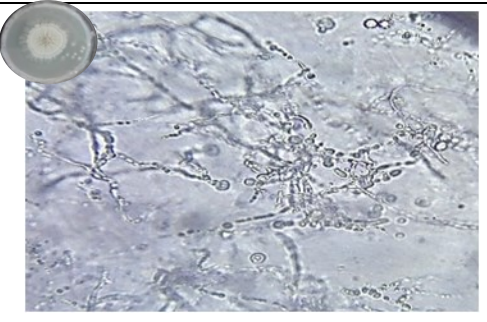

L'examen microscopique des cultures fongiques effectué par la méthode de scotch au grossissement x 40 a permis de déterminer le genre de chaque isolat et même l'espèce de certains. Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau suivant :

Tableau 5. Aspects microscopiques des champignons filamenteux isolés.

code des isolats	Caractères microscopiques	
Isolats N°=01 A4 10-3		Conidiophore: lisse, hyalin, très long. Conidies: globuleuses, brunes, souvent disposées en chaînes. Tête aspergillaire: bisériée radiée, noire . <i>Aspergillus niger</i>
Isolats N°= 02 A1 11/2(5) sol mere		Hyphes : septés brunes Spores : il ya deux types petite et grande <i>Aureobasidium sp.</i>
Isolats N°= 03 A1 17/2(3) sol mere		Non identifié
Isolats N°=04 A617/2 10 -3		Hyphes : septés. Conidies : sont brunes, d'aspect ovoïde <i>Bipolaris sp.</i>

<p>Isolats N°=05 A111/2 (1) blanc 10-2</p>		<p>Non identifié</p>
<p>Isolats N°=06 A4 24/2 10-2</p>		<p>Conidiophores : fins, dressés à angle droit sur thalle végétatif. Conidies : hyalines, très fines. <i>Scedosporium sp.</i></p>
<p>Isolats N°=07 A3 19/2 10-3</p>		<p>Hyphes : septés, sont pigmentés. La paroi des conidies : extrémités des cicatrices de bourgeonnement <i>Cladosporium cladosporoides</i></p>
<p>Isolats N°=8 A5 17/3sol mere</p>		<p><i>Fusarium sp.</i></p>
<p>Isolats N°=9 S17/3</p>		<p>Non identifié</p>

<p>Isolats N°=10 A6 17/2 (1)</p>		<p>Conidiophore: court, lisse, et incolore.</p> <p>Conidies: globuleuse, petites.</p> <p>Tête aspergillaire: unisérié.</p> <p><i>Aspergillus fumigatus</i></p>
<p>Souche No= 11 A1 17/2 (4)</p>		<p>Non identifié</p>
<p>Isolats N°=12 A6 20/2(2)</p>		<p>Conidies: brunes, lisses , produites en chaines, cloisonnées longitudinalement et transversalement.</p> <p>Conidiophores: septés, lisses.</p> <p><i>Alternaria alternata</i></p>
<p>Isolats N°=13 A9 11/9</p>		<p>Conidiophore: court, lisse, et incolore.</p> <p>Conidies: globuleuse, petites.</p> <p>Tête aspergillaire: unisérié.</p> <p><i>Aspergillus sp1.</i></p>
<p>Isolats N°=14 A1 AS 7/3</p>		<p>Hyphes : septés, hyalines.</p> <p>Phialides : serrées les unes contre les autres, l'ensemble donne une image de pinceau.</p> <p>Conidies rondes, hyalines.</p> <p><i>Penicillium sp1.</i></p>

Isolats N°=15 A1 14/2(3)		Non identifié
Isolats N°=16 A5 17/2		Hyphes : septés, hyalines. Phialides : sont serrées les unes contre les autres ,l'ensemble donne une image de pinneau Conidies : sont rondes <i>Penicillium sp2.</i>

La majorité de notre isolats sont des mycètes mélanisés appartenant aux genres *Cladosporium*, *Alternaria*, *bipolaris*, *Aspergillus*; les mycètes mélanisés se caractérisent par des spores et de mycélium sombre donc ils peuvent tolérer la déshydratation, mieux que les champignons dont les cellules sont dépourvus de mélanine (Dendouga *et al.*, 2015).

3. 3. Test de tolérance à la salinité

Le repiquage au centre de chaque isolat sur PDA préparé avec deux concentrations de NaCl (10% et 17.5%) a permis d'obtenir les résultats présentés dans le tableau 6.

Tableau 6. Test de tolérance à la salinité.

Isolats	PDA à 10% NaCl	PDA à 17.5 % NaCl
A4 10-3	+	+
A1 11/2(5)	-	-
A1 17/2(3)	-	-
A617/2	-	-
A111/2 (1)	-	-
A4 24/2	+	-
A3 19/2	-	-
A5 17/3	-	-
S17/3	+	-
A6 17/2 (1)	+	+
A1 17/2 (4)	+	+
A6 20/2(2)	-	-
A9 11/9	-	-
A1 AS 7/3	+	-
A1 14/2(3)	-	-
A5 17/2	+	+

A une concentration de 10% de NaCl, on a remarqué la croissance mycélienne chez 7 isolats, ces résultats permettent de les considérer comme des mycètes halotolérants. A une concentration de 17.5% de NaCl, on a noté la croissance mycélienne uniquement chez 4 isolats, ces résultats permettent de les considérer comme des mycètes halophiles. Cette classification est basée sur ce qui a été rapporté par Imran *et al.*, (2012). Ce caractère d'halotolérance ou d'halophilie confirme l'originalité de nos isolats au milieu extrême, et qu'il s'agit bien des isolats autochtones.

4. Mise en évidence de l'activité enzymatique

4.1. Activité amylolytique

Les résultats obtenus après l'ensemencement des différents isolats sur milieu gélosé à base d'amidon ont permis la mise en évidence de l'activité amylolytique, confirmée par l'apparition d'une zone claire autour de la colonie productrice, dont le diamètre varie de 3 à 10 mm. Ces résultats permettent de considérer ces isolats comme des producteurs d'amylase exocellulaire (Figure.3 et 4).

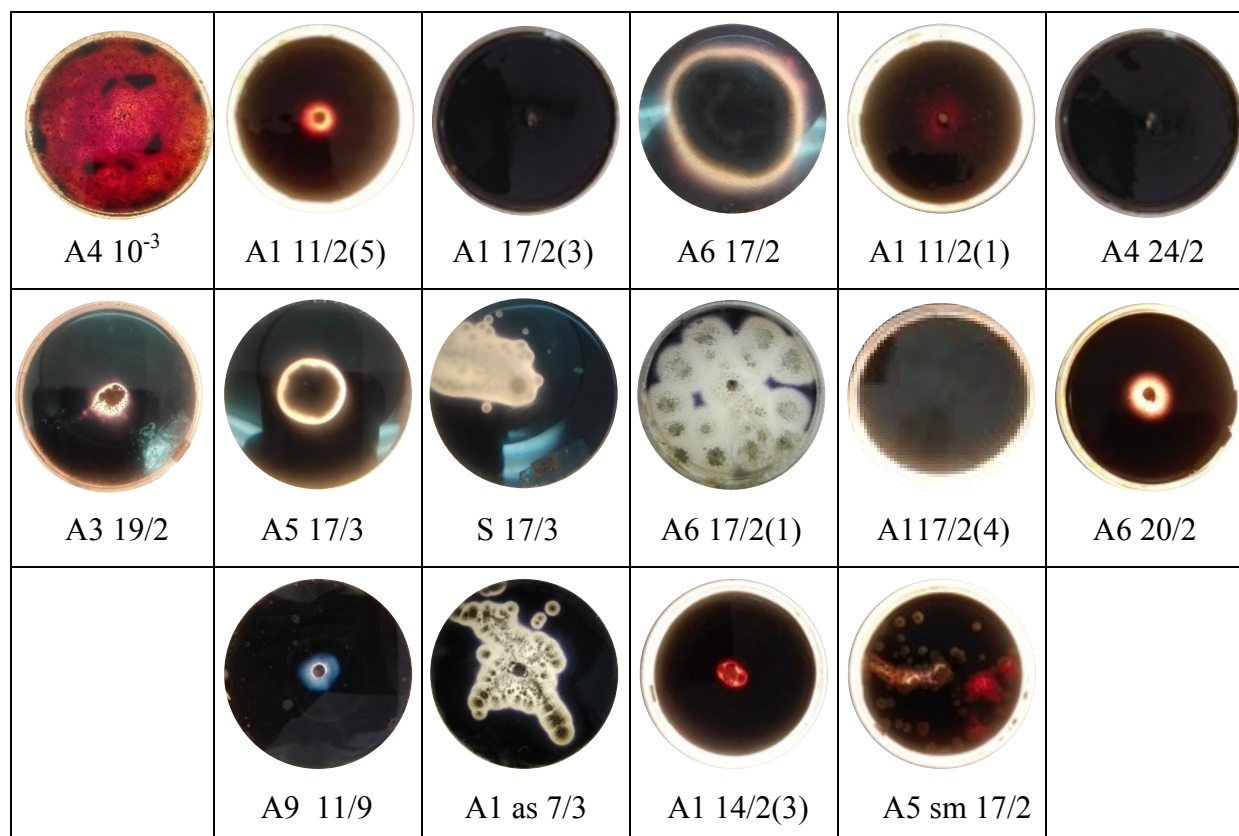


Figure 3. Mise en évidence de l'activité amylolytique

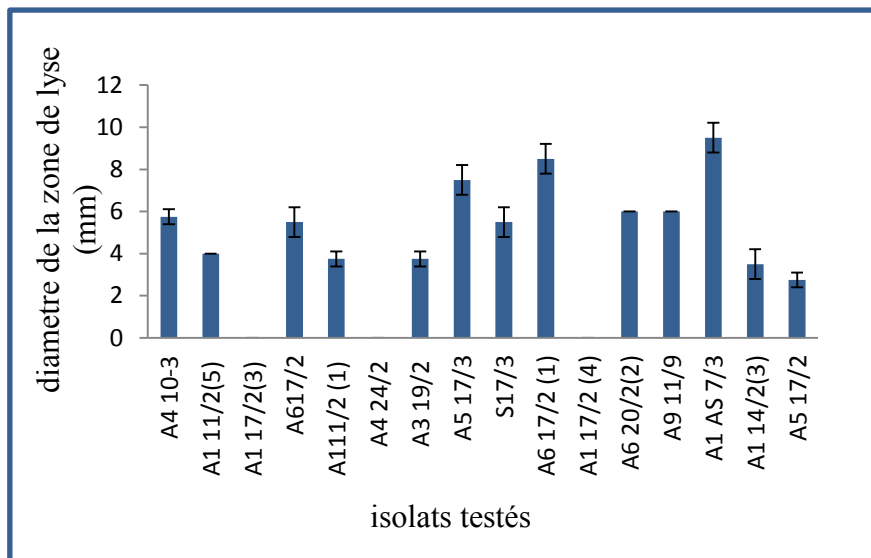


Figure 4. Diamètre de la zone d'hydrolyse d'amidon en mm

L'analyse des résultats présentés dans la figure 3 permet de révéler l'hydrolyse d'amidon chez la majorité de nos isolats. Des résultats similaires sont trouvés sur des champignons filamenteux appartenant aux différents genres (Balkan et Ertan, 2007; Mishra et Dadhich, 2010).

4.2. Activité cellulosique

La recherche de l'activité cellulosique extracellulaire dans notre collection de moisissures isolées a abouti aux résultats présentés dans la figure 5.

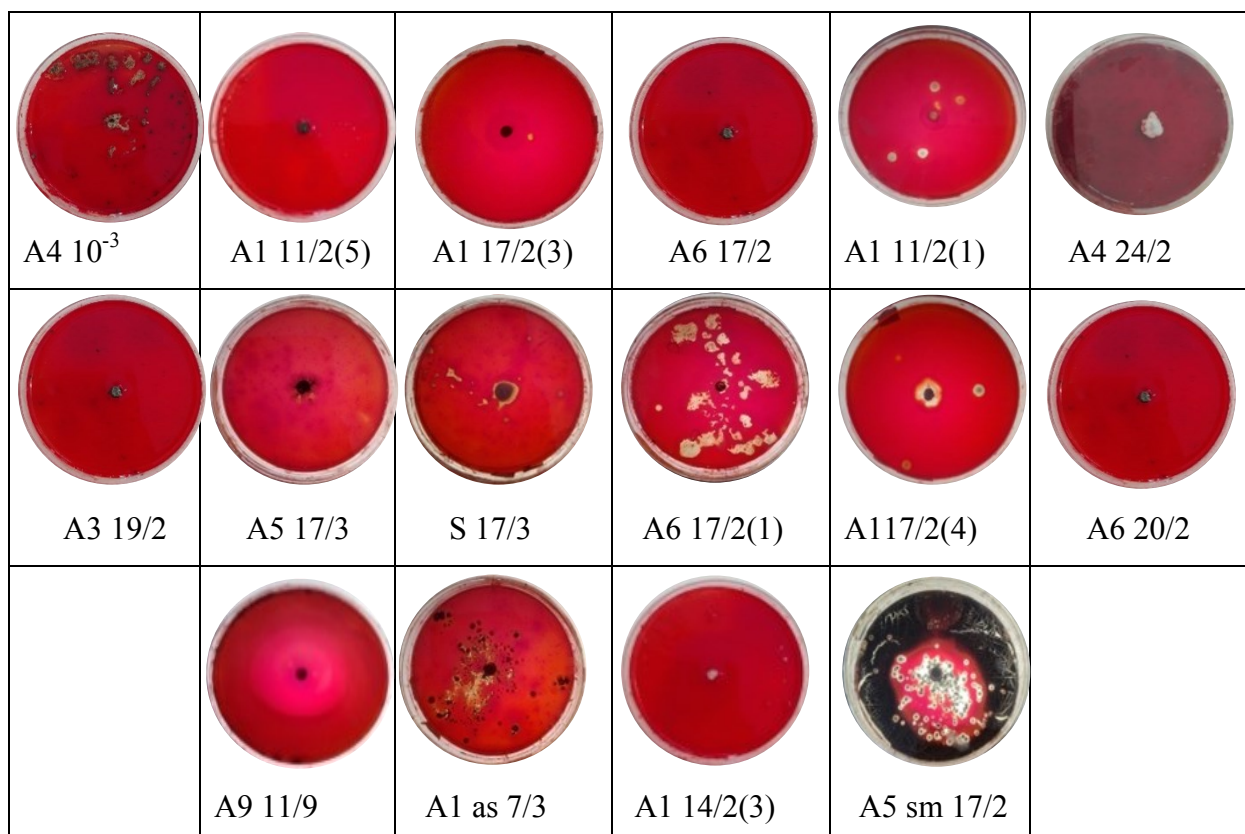


Figure 5. Mise en évidence de l'activité cellulosique.

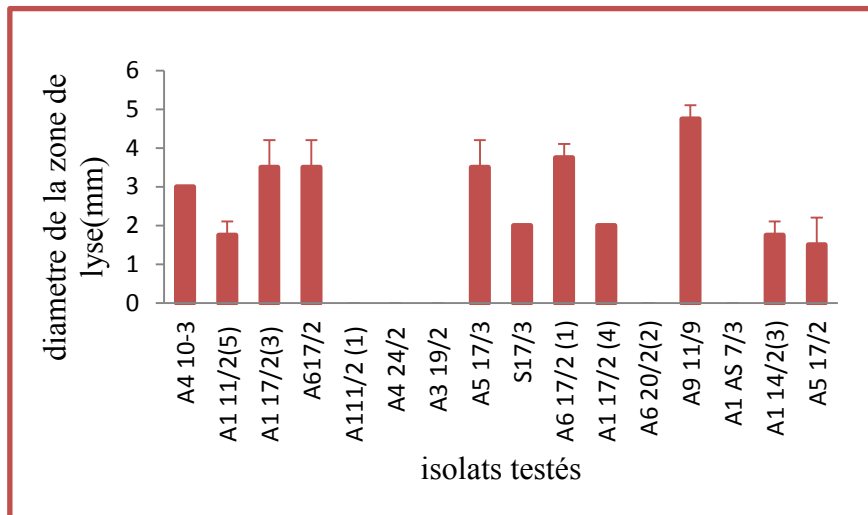


Figure 6. Diamètre de la zone d'hydrolyse CMC en mm

L'analyse des résultats présentés dans la figure 6 permet de révéler l'hydrolyse de carboxymethylcellulose (CMC) chez la majorité des isolats testés avec pourcentage de 68.75%. Plusieurs espèces appartenant au genre *Aspergillus* (Fujita *et al.*, 2002) et au genre *Penicillium* sont décrites comme étant cellulolytiques (Nogawa *et al.*, 2001).

1. Activité pectinolytique

Les résultats obtenus après l'ensemencement des différents isolats ont permis la mise en évidence de l'activité pectinolytique

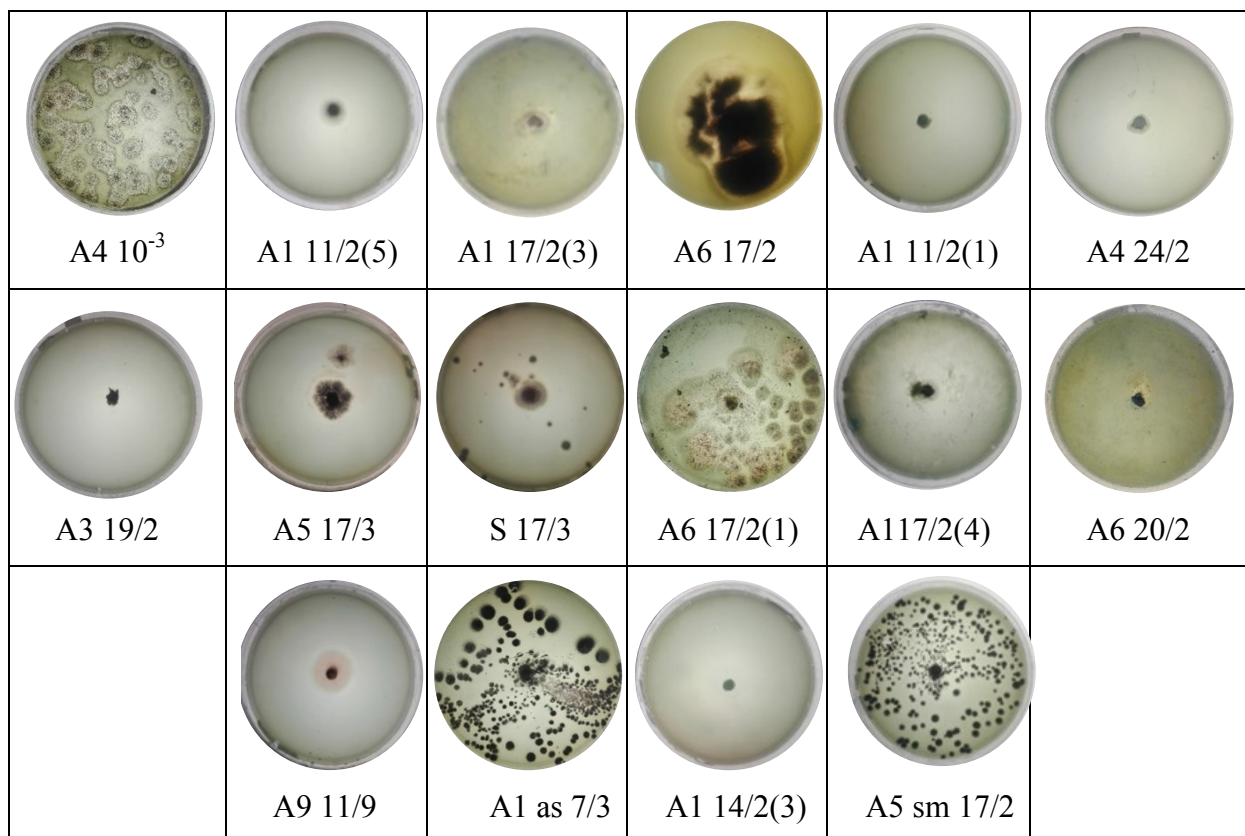


Figure 7 . Mise en évidence de l'activité pectinolytique

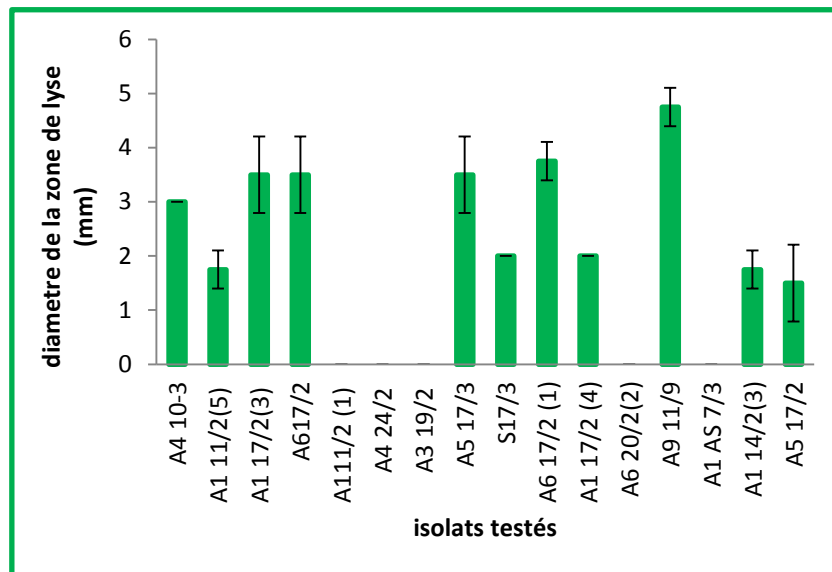


Figure8. Diamètre de la zone de lyse de pectine en mm

L'analyse des résultats présentés dans la figure 8 permet de révéler l'hydrolyse de substrats pectinolytiques chez la majorité des isolats des champignons filamenteux à 68.75%.

4. Activité protéolytique

4.1. Caséinase

Les résultats obtenus après l'ensemencement des différents isolats sur milieu gélosé à 30% sont présentés dans les Figures 9 et 10.

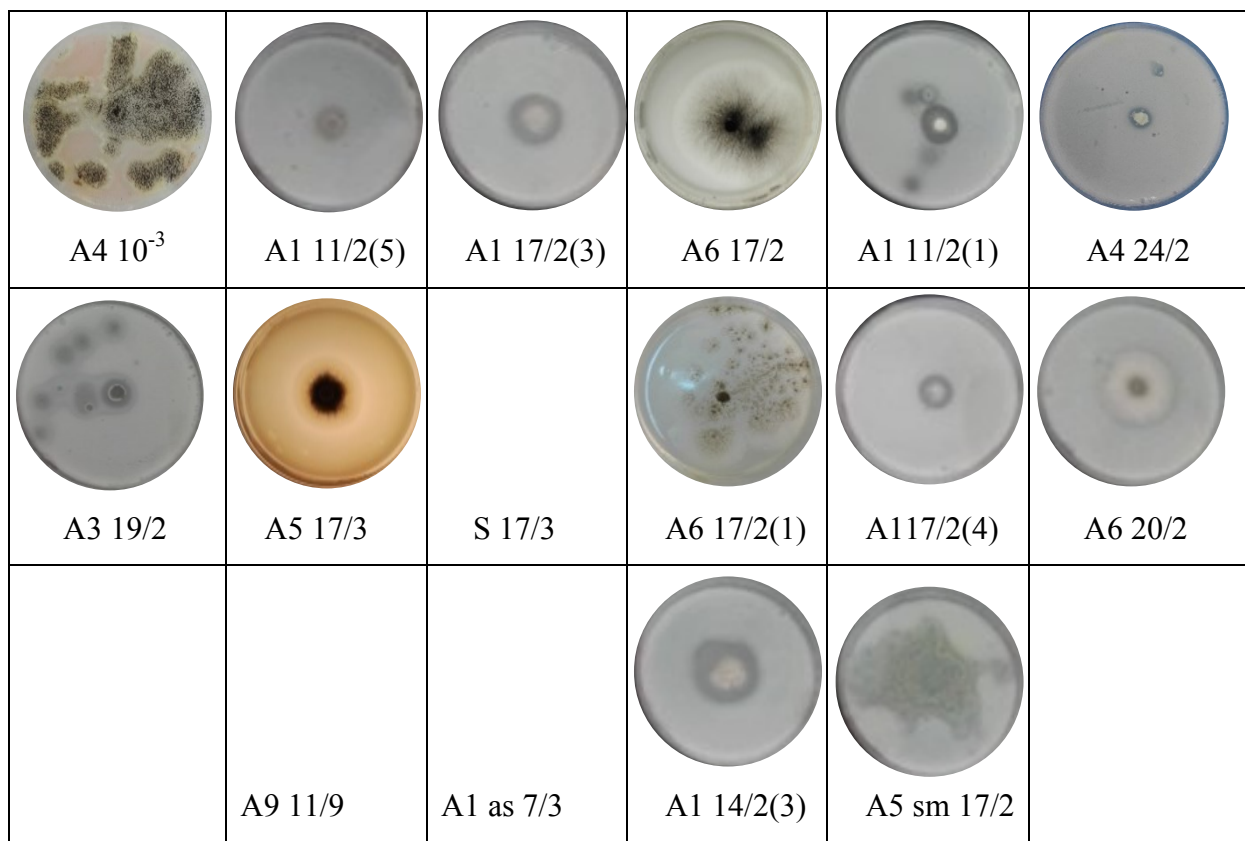


Figure 9. Mise en évidence de l'activité protéolytique sur GL à 30 %

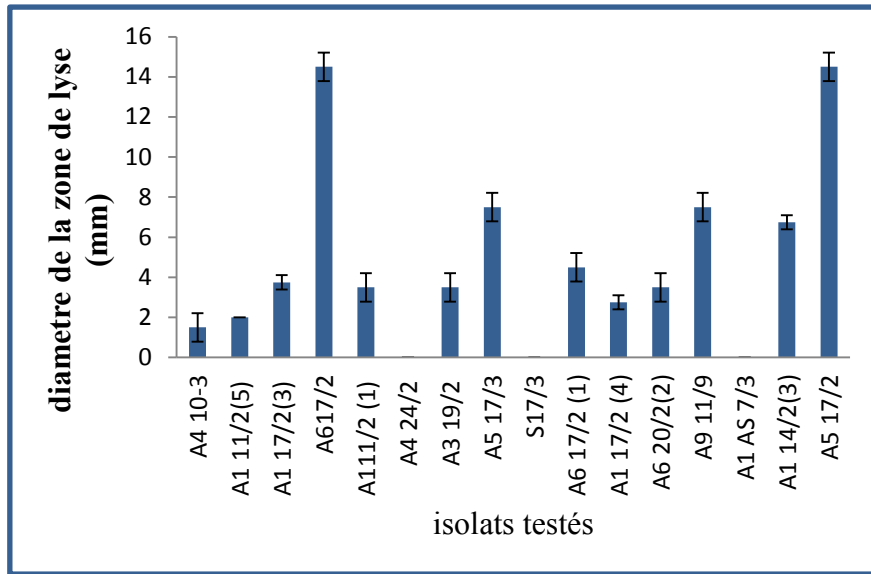


Figure 10. Diamètre de la zone de lyse de caséine en mm

Toute colonie entourée par une zone claire (opaque) est considérée comme productrice de protéase. Ce test a révélé la production de protéase exocellulaire chez 81.25%.

4.2.Gélatinase

Les résultats de l'ensemencement des différentes souches sur gélose gélatinée résumés dans Les figures suivantes

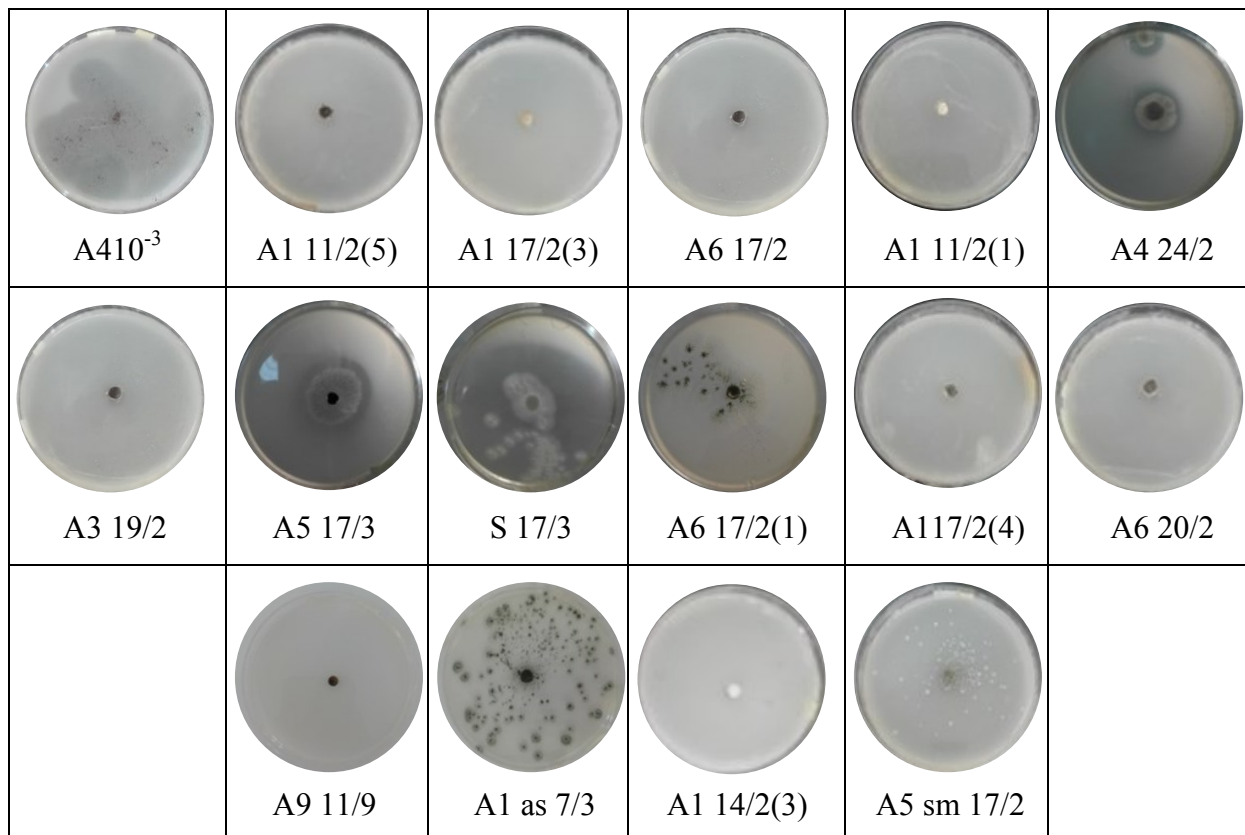


Figure 11. Mise en évidence de l'activité de l'activité protéolytique sur milieu gélatiné

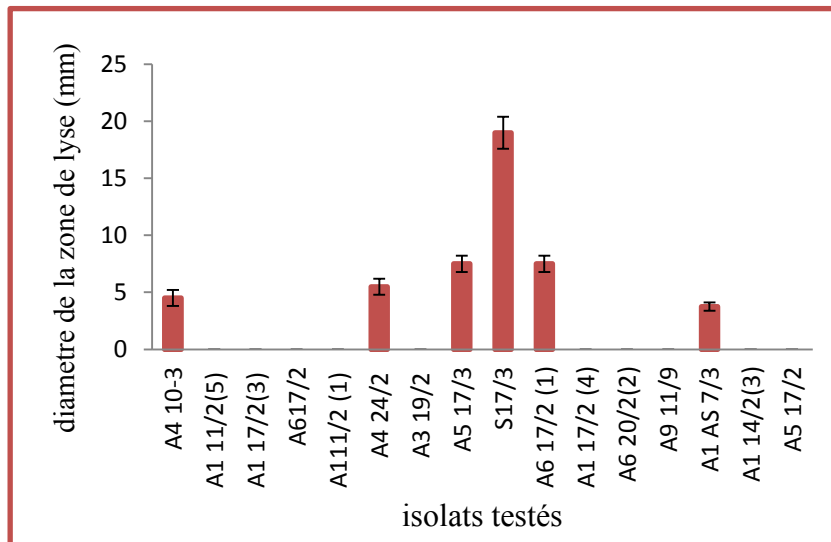


Figure 12. Diamètre de la zone de lyse de gélatine en mm.

Ces résultats permettent de considérer ces souches comme des moisissures productrices de gélatinase exocellulaire capable de dégrader la gélatine

5. Lipase

Les résultats de l'ensemencement des différents isolats sur milieu à base d'huile d'olive 2.5% sont présentés dans la figure

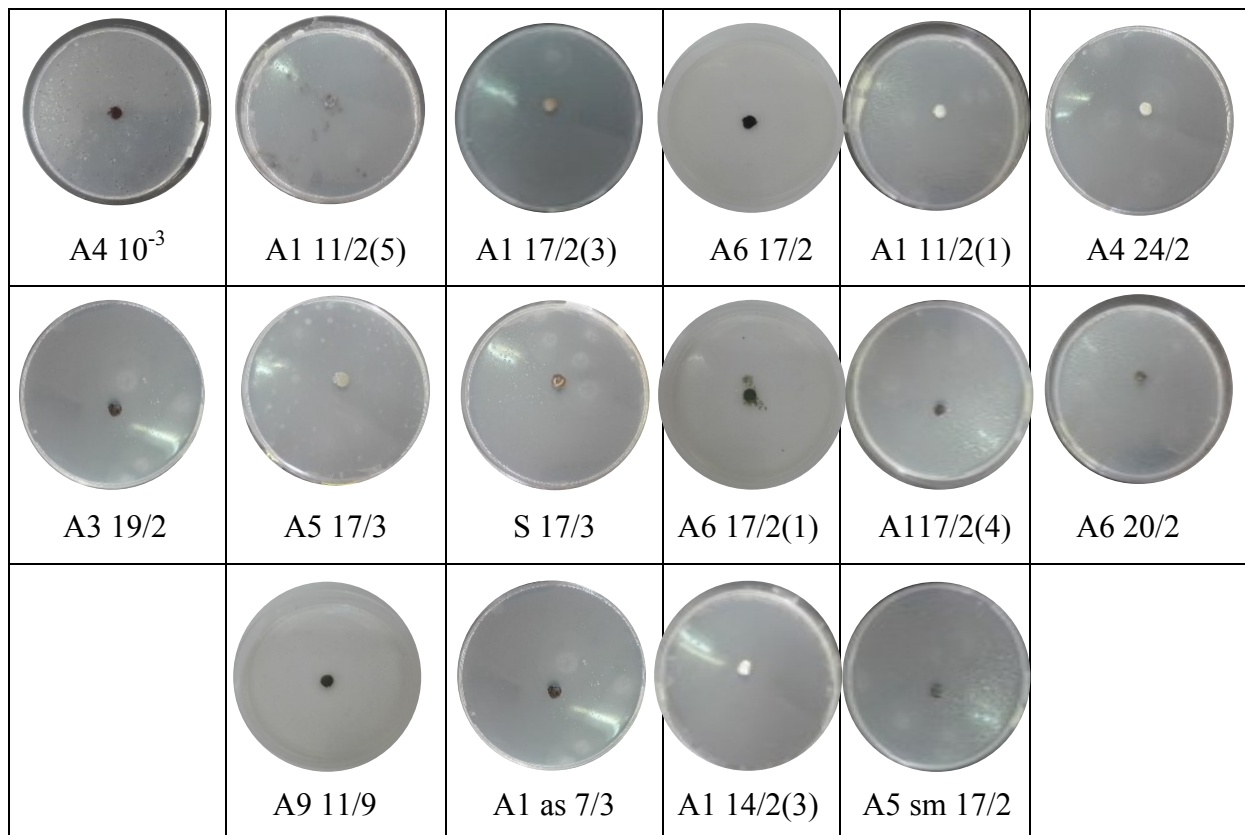


Figure 13. Mise en évidence de l'activité lipolytique

Ce teste a révélé la production de lipase chez l'isolatA4appartenant au genre *Aspergillus*.

Conclusion

Conclusion

L'objectif principal de la présente étude est d'isoler des champignons filamenteux à partir de Chott Melghir ; choisi comme milieu extrême, ainsi que d'étudier le profil hydrolytique des isolats obtenus.

L'analyse physicochimique de nos échantillons prélevés du sol environnant Chott Melghir, a montré que la région d'étude se caractérise par un pH alcalin, un taux de matière organique très faible, une conductivité électrique très élevée avec taux élevée ion de chlorure, ces analyses nous confirment qu'il s'agit bien d'un milieu extrême, en particulier par rapport à la salinité.

L'analyse mycologique a confirmé la conclusion tirée des analyses physicochimiques avec la pauvreté des échantillons examinés en biomasse fongique, où parmi neuf échantillons du sol examinés on a obtenu uniquement 16 isolats de moisissures. D'une autre part, ces analyses ont montré la dominance des mycètes mélanisés, le genre *Aspergillus* et *Penicillium* dans le sol de Chott Melghir, ce qui permet de conclure que ces mycètes possèdent des stratégies d'adaptation écologique aux conditions environnementales extrêmes.

La mise en évidence de la production de cinq hydrolases extracellulaire (protéase, l'amylase, la cellulase, pectinase,) testée sur milieu solide a montré que tous les isolats examinés possèdent au moins l'une des activités testés, avec la dominance de l'activité protéolytique et amylolytique. Cela nous permet de déduire l'importance de ces deux hydrolases dans l'adaptation écologique des champignons filamenteux à la pauvreté des milieux extrêmes en sources nutritives.

Ces résultats ouvrent des nouvelles perspectives pour l'identification de nos isolats de moisissures au niveau d'espèce par les techniques de biologie moléculaire, ainsi que de tester leur production en hydrolases en milieu liquide, pour des éventuelles applications biotechnologiques.

Bibliographie

Bibliographie

Ait Abdelouahab N. 2001. Microbiologie alimentaire. Office des publications universitaires, 52 p.

Amrani F. et Benallel L.2008. Isolement des actinomycètes à partir des sols contaminés par les hydrocarbures dans la région de Hassi-messaoud. Mémoire de fin d'étude supérieure en biologie. Université de Kasdimarbah, Ouargla (Alger). 57 p.

Antranikian G., Vorgias G.C., Bertoldo C.2005. Extreme environments as a resource for microorganisms and novel biocatalysts. Adv. Biochem. Engin. Biotechnol., 96, pp. 219-262.

Antranikian G.2008. Industrial relevance of thermophiles and their enzymes in: Thermophiles, biology and technology at high temperatures. Ed. Robb 8. CRC Press, New York. pp.114-147.

Anwar A. and Saleemuddin M.1998. Alkaline proteases: a review. Bioresour. Technol., 64, pp. 175-183.

Ashok P.2006. Enzyme technology. Springer, France. pp. 319-321.

Aubert G., 1978. Méthodes d'analyses des sols. FAO, France. 191p.

Aygan A., Arikan B.2008. A new halo-alkaliphilic, thermostable endoglucanase from moderately halophilic *Bacillus* sp. C14 isolated from Van soda lake. Int J Agric Biol 10, pp. 369-374.

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

Bauchart D. et Picard B.2010. Muscle et viande de ruminant. Quae. Paris. 145p.

Bernard B.1997. Dictionnaire: plants et champignons. ESTM, Paris. p. 513

Bhat M. K.2000. Cellulases and related enzymes in Biotechnology. Biotechnol Adv. 18, pp. 355-383.

Boiron P.1996. Organisation et biologie des champignons. Edition Nathan. pp. 13-79.

Botton B., Beton A., Fever M., Gaithier S., Guyp H., Larpent J.P., Reymond P., Sanglier J.J., Vayssie Y., Veau P.1990. Moisissures utiles et nuisibles importance industrielle. 2eme édition. Masson .Collection Biotechnologies. pp. 34-428.

Botton B., Breton A., Fevre M., Ganthier S., Guxp H., Larpent J.P., Reymond P., Sanglier J.J., Vayssier Y. et Veau P.1990. Moisissures utiles et nuisibles importances industrielles. 2 Ed.3 Ed. Milan Barcelone mexico. Paris. 120p.

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

Bouchet P.H., Giraud J.L. and Vihard J.1999. Les champignons : mycologie fondamentale et appliquée. Masson (ed). pp. 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. pp. 216-244.

Bourgeois C.M., Mescle J.F., Zucca J.1996. Microbiologie alimentaire. Aspect microbiologique de la sécurité et de la qualité des aliments. Tome 1. Lavoisier. Paris. pp. 236-246.

Bourgeois C. M. et Larpent J. P.1996. Microbiologie alimentaire. Lavoisier TEC et DOC, Paris. pp. 54-55.

Branger A., Richer M. M. et Roustel S.2007. Alimentation, sécurité et contrôles microbiologie. Educagri, France. pp. 35-79.

Calvet R.2000. Le sol propriétés et fonctions, constitution et structure phénomènes aux interfaces. Tome 1. Edition France agricole. Paris (France), pp. 83-90.

Calvet R.2000. Le sol : Propriétés et fonction. *France agricole*, Paris. pp. 83-90.

Cavicchioli R., Amils R., Wagner D. et McGenity T.2011. Life and applications of extremophiles. *Environ. Microbiol.* 13, pp. 1903–1907.

Dassarma S., et Dassarma P. 2012. Halophiles. In eLS, *John Wiley & Sons, Ltd*, p.

DasSarma, S. 2001. Halophiles. *Encyclopedia of Life Sciences*. pp. 1-9

Davet P.1996. Vie microbienne du sol et production végétale. INRA. Paris. pp. 52-57.

Dendouga W., Boureghda H., Belhamra M. 2015. Edaphic factors affecting distribution of soil fungi in three chotts located in Algeria desert. *Courrier du Savoir (19)* : 147-152.

Dendouga W.2006. Isolement et identification de moisissures productrices de protéase à partir de milieux extrêmes. Extraction et étude des propriétés de la protéase produite. Mémoire de magistère. Université Mentouri, Constantine. 120 p.

Echigo A., Hino M., Fukushima T., Mizuki T., Kamekura M. and Usami R. 2005. Endospores of halophilic bacteria of the family *Bacillaceae* isolated from non-saline

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

Franco O. L., Rigden D. J., Melo F. R., Bloch C., Silva J. C. P. et Crossi de Sa M. F. 2000. Activity of wheat amylase inhibitors towards bruchid α -amylase and structural explanation of observed specificities. *Eu. J. Biochem* (267): 2166-2173.

Gao X.G., Cao S.G. and Zhang K. 2000. Production, properties and application to non aqueous enzymatic catalysis of lipase from a newly isolated *Pseudomonas* strain. *Enzym. Microb. Technol.* 27, pp. 74–82.

Genevès L. 1990. Champignons. In (Biologie Végétale: thallophytes et microorganismes). Ed. *Dunod*. Paris. pp. 59-90.

Genevès L. 1992. Les thallophytes. In (Reproduction et développement des végétaux) Ed. *Dunod*. Paris, pp. 5-16.

Ghanem A. 2007. Trends in lipase-catalyzed asymmetric access to enantiomerically pure/ enriched compounds. *Tetrahedron* 63(8), pp. 1721-1754.

Griffin D. H. 1994. *Fungal Physiology*. 2nd. *Wiley-Liss*, New York, pp. 45-80.

Guezlane T. N., Kahloche B. et Athmani G. S. 2011. *Microbiologie travaux pratiques*. Office des publications universitaires. 4 ème édition. Alger. pp. 29-42.

Guiraud J. P. 2003. *Microbiologie alimentaires*. Dunod, Paris, 333 p.

Gunde-Cimeraman N., Ramos J., Plemenitas A. 2009. Halotolerant and halophilic fungi. *Mycol. res.* 113, pp. 1231-1241.

Gupta R., Gigras P., Mohapatran H., Goswami K.V., Chauhan B. 2003. Microbial α - amylase: a biotechnological perspective. *Process Biochem* 38, pp. 1599-1616.

Gusakov A. V., Sinitsyn A. P., Markov A. V., Skomarovsky A. A., Sinitsyna O. A., Berlin A. G., Ankudimova N. V. 2000. Indigo-binding domain in cellulase molecule. *Biocatalysis fundamentals and applications*. 11 (6), pp. 77-80.

Hankin L and Anagnostakis S.L. 1975. The Use of Solid Media for Detection of Enzyme Production by Fungi. *Mycologia* 67(3):597-607.

Hasan F., Ali Shah A. and Hameed A. 2006. Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme and Microbial Technology*. 39, pp. 235-251.

Hibbett D.S., Binder M., Bischoff J.F., *and al.* 2007. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycological Research* 111, pp. 509-547.

Hoondal G., Tiwari R., Dahiya N. and Beg Q. 2002. Microbial alkaline pectinases and their industrial applications: a review. *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 59, no. 4-5, pp. 409–418.

Horikoshi K. 1999. Alkaliphiles: Some applications of their products for biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* ; vol. 63, pp. 735-750.

- Irwin J. A., Baird A. W. 2004. Extremophiles and their application to veterinary medicine. *Irish Veterinary Journal*. Volume 57 (6).
- Irwin J.A. and Baird A.W. 2004. Extremophiles and their application to veterinary medicine. *Ir. Vet. J.* 57, pp. 348–354.
- Jacques R.2000. Biotechnologie enzymatique. *Doin*, France. pp. 1-7.
- Jaeger K. E. and Eggert T. 2002. Lipases for biotechnology. *Current opinion in biotechnology*. 13, pp. 390-397.
- Jaeger K. E. and Reetz M. T. 1998. Microbial lipases from versatile tools for biotechnology. *Trends biotechnol.* 16, pp. 396-403.
- Japanese soil may be transported by Kosa event (Asian dust storm) *Saline Systems*,1. 8p.
- Jean P.1993. Enzyme. Office des publications universitaire. Paris. 381p.
- Kikani B.A. and Singh S.P. 2011. Single step purification and characterization of a thermostable and calcium independent α -amylase from *Bacillus amyloliquifaciens* TSWK1-1 isolated fromTulsi Shyamhot spring reservoir, Gujarat (India). *International Journal of Biological Macromolecules*, vol.48 , no.4, pp. 676-681.
- Kitano K., Morita S., Kuriyama M. and Maejima K. 1992. Alkaline protease gene from a *Fusarium* species. *Eur Patent Appl EP*, pp. 519-229.
- Korish M., 2003. Production, Purification, Properties and Application of the Cellulases from a Wild type Strain of a Yeast isolate. Thèse de doctorat d'état,university Mainz ,Egypt ,131p.
- Kristjansson J.K. and Hreggvidsson G.O. 1995. Ecology and habitats of extremophiles. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*; vol. 11, pp. 17-25.
- kristjansson J.K., Hreggvidsson G.O. 1995. Ecology and habitats of extremophiles. *World journal of microbiology and biotechnology* 11, pp. 17-25.
- Kuhad R.C., Gupta R. and Singh A. 2011. Microbial cellulases and their industrial applications. *Enzyme Research* .Vol. 201. 10 p.
- Kumar D., Savitri N., Thakur N., Verma R., Bhalla T. 2008.Microbial proteases and application as laundry detergent additive. *Res.J. Microbiol* 3 : 661-672.
- Lang C. et Dornenburg H. 2000. Perspectives in the biological function and the technological application of polygalacturonases. *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 53, no.4, pp. 366–375.
- Larpent-Gourgaud M., Sangler J.J. 1992. Biotechnologies : principes et méthodes – Collection Biosciences et techniques. Ed. Doin.Paris. 571 ; pp. 61-64.

- Larreta G. V. 1997. Enzymes en agroalimentaire. Lavoisier TEC et DOC. Paris. 380p.
- Lekchiri S., Moueqqit M., Lekchiri A. 2006. Mise en évidence d'une activité cellulase chez *Fusarium oxysporum f.sp albedinis* induite par une nouvelle forme d'hydrocellulose purifiée. Faculté des Sciences, Département de Biologie, Faculté des Sciences, Université Mohamed Ier, Oujda, Maroc.
- Leveau S. B. et Bouix M. 1993. Les microorganismes d'intérêt industriel. *Lavoisier Apria*, p. 112
- Madigan M.T. and Martino J.M. 2006. Brock Biology of Microorganisms, 11th ed.; Pearson Education. Upper Saddle River, NJ, USA.
- Mahanta N., Gupta A. and Khare S.K. 2008. Production of protease and lipase by solvent tolerant *Pseudomonas aeruginosa* PseA in solid state fermentation using *Jatropha curcas* seed cake as substrate. *Bioresour. Technol.*, 99, pp. 1729-1735.
- Marouf A. et Reynaud J. 2007. La botanique de A à Z. Edition : Paris. P342.
- Martins R.F., Davids W., Al-Sond W.A., Levander F., Radström P. and Hatti Kaul R. 2001. Starch-hydrolyzing bacteria from Ethiopian soda lakes. *Extremophiles*, vol.5, pp. 135-144.
- Meyer A., Deiana J. et Bernard A. 2004. Cours de microbiologie générale avec problèmes et exercices corrigés. *Doïn*, Paris. pp. 72-206.
- Mishra. B. et Dadhich. S. K. (2010). Production of Amylase and Xylanase Enzymes from Soil Fungi of Rajasthan. Department of Molecular Biology and Biotechnology. (1): 21 -23.
- Morozkina E.V., Slutskaia E.S., Fedorova T.V., Tugay T.I., Golubeva L.I. and Koroleva O.V.2010. Extremophilic microorganisms: Biochemical adaptation and biotechnological application. *Applied Biochemistry and Microbiology*; vol.46, pp. 1-14.
- Najjar A. 2010. Etude quantitative de la sécrétion de lipase, de la lipolyse et du stockage de lipides chez *Yarrowia lipolytica* lors de sa croissance en présence d'huile d'olive. Thèse. Microbiologie et Biotechnologies.
- Nasraoui B. 2006. Les champignons parasites des plantes cultivées. Biologie, systématique, pathologie, maladie. Centre de publication universitaire. Tunisie.
- Neklyudov A.D., Ivankin A.N. and Berdutina A. V.2000. Properties and uses of protein hydrolysates. American society for biotechnology, New York. pp.459

Nicklin J., Graeme-Cook K., Paget T., Killington R. 2000. L'essentiel en microbiologie. Edition Berti. pp. 210-216.

Peciulyte D. 2007. Isolation of cellulolytic fungi from waste paper gradual recycling

Peduzzi R., Tonolla M., Boucher-Rodoni R. 2006. Milieux extrêmes : Conditions de vie en milieu alpin et milieu marin, Actes et contributions scientifiques : 9.

Petersen M. et Daniel R. 2006. Purification and characterization of an extracellular lipase from *Clostridium tetanomorphom*. World journal of microbiology & Biotechnology. 22: 431-435.

Pikuta E. V. and Hoover R. B. 2007. Microbial extremophiles at the limits of life. *Crit. Rev. Microbiol.*, 33, pp. 183-209.

Prazeres J., Cruz J. and Pastore G.M. 2006. Characterization of alkaline lipase from *Fusarium oxysporum* and the effect of different surfactants and detergents on the enzyme activity. *Braz. J. Microbiol* ; 37, pp. 505-509.

Prescott L. M., Harley J. P. and Klein D. A. 2003. Microbiologie. De Boeck université, France. pp. 104-564.

Quenea k. 2004. Etude structurale et dynamique des fractions lipidiques et organiques réfractaires de sols d'un chrono séquence forêt/maïs (Cestas, sud-ouest de la France). Thèse de doctorat. Université de paris 6 (France).

Quérellou J., Guézennec J. 2010. Biotechnologie des extrêmophiles. Editions Tech. *Ing. BIO580*, pp. 1-13.

Rao M. B., Aparma M., Tanksale A. M., Mohini S., Ghatge M. S. and Vasanta V. 1998. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. American society for microbiology, New York. pp. 69.

Raven P.H., Evert F. et Eichhorn Susan E. 2000. Biologie végétale, Edition : Paris. 968p.

Reis P., Holmberg K., Watzke H., Leser M., Miller R. 2008. Lipases at interfaces: a review. *Advances in colloid and interface science*, 237-250.

Remli S., Bounouala M. 2016. Contribution géochimique-minéralogique et optimisation du processus de cristallisation par énergie solaire: cas de salin du chott Merouane d'El Oued. Unité de Recherche Appliquée en Energies Renouvelables. 1-7.

Ronald A. et Atlas M. 1997. Hand book of microbiology media. 2^{ème} Edition. New York.

Satyanarayana T., Raghukumar C., Roswall T. and Shivaji S. 2005. Extremophilic microbes: Diversity and perspectives. *Current Science*. pp. 1-89.

- Schmidt B. M., Baumann M., Henke E., Konarzycka-Bessler M. and Bornscheuer U.T. 2004. Directed evolution of Lipases and Esterases. *Methods in enzymology*. 388, pp. 199-207.
- Scriban R. 1999. Biotechnologies. 5ème édition. Techniques et Documentation Lavoisier. pp.149-157.
- Scriban R.1993. Biotechnologie. 4ème édition. Technique et Documentation–Lavoisier,Paris. 40 p.
- Semal A., Fraselle J., Impens R., Kummert J., Lepoivre P., Meulimans M., Seilleur P., Vendrevenen J. et Viseur J. 1993. Traite de pathologie végétale. presse agronomique de gembloux belgique. pp.178-194
- Serge W. et Pierre M.2004. Toute la biochimie. *Dunod*, Paris. pp. 91-92.
- Simon J. C. et Barry V. M.2005. Les enzymes: applications industrielles et analytiques. Megazyme, France. pp. 1-3.
- Souza P.M. 2010.Application of microbial α -amylase in industry – a review. *Brazilian Journal of Microbiology*. (41) : 850-861.
- Strullu D.G.1991. Les mycorhizes des arbres et des plantes cultivées .Edition : Tec et Doc.Lavoisier, Paris. 248p.
- Sylvie P.2015. La classification des champignons. Laboratoire de botanique, phytochimie et mycologie / umr - cnrs 5175 cefe, faculté de pharmacie, France.
- Tatiana daCosta RP, and Flevo F. 2005. Extraction and assay of pectic enzymes fromPeruviancarrot (*Arracaciaxanthrriza* Bancroft). *Food Chem*. 89, P : 85-92.
- Thibault J.F., Petit R.1979. Les substances pectiques : généralités et domaines d’application dans les industries alimentaires, 12 ; pp. 233-251.
- Tortora J., Funk B.F. and Case C.I. 2003. *Introduction à la microbiologie*, (edn) ISBN. Canada.
- Uchikoba T., Mase T., Arima K., Yonezawa H. and Kaneda M. 2001. Isolation and characterization of a trypsin-like protase from *Trichoderma viride*. *Biol. Chem*. 382, pp. 1509-1513.
- Vierling E. 2008. Aliments et boissons: technologies et aspects réglementaires. Doin, France. pp. 80.
- Voet D. et Voet J. G. 2005. Biochimie.2eme édition. Boek. Université. pp. 459-539.
- Wang X., XU X., WU M., and Yang Y. 2002. Induction and regulation of cellulase formation in two trains of fungi by different carbon sources. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 8(6), 653-657.

Annexes

Annexe 01. Analyse physicochimique du sol.

Dosage du carbone et matière organique.

➤ Préparation des solutions.

- Solution bichromate de potassium ($K_2Cr_2O_7$) à 8%: Dissoudre 49.04 g de $K_2Cr_2O_7$, séché à $200^\circ C$ dans 1 L d'eau distillée.

- Solution d'acide sulfurique concentré (H_2SO_4) à 96%.

- Acide phosphorique (H_3PO_4) à 86%.

- Indicateur à la diphénylamine: dissoudre 0.5 g dans un mélange de 20 ml d'eau distillée et de 100 ml d'acide sulfurique concentré. Diluer d'abord l'acide sulfurique dans l'eau sous jet d'eau (réaction exothermique puis y dissoudre l'indicateur).

- Sel de mohr 1 N : dissoudre 278 g de sulfate de fer ($F_2SO_4, 7H_2O$) dans 800 ml d'eau distillée dans une fiole jaugée de 1000 ml, ajouter 5 ml de H_2SO_4 concentré, puis compléter avec l'eau distillée jusqu'à 1 L.

➤ Mode opératoire.

- Peser 1 g de sol dans un bécher de 500 ml.

- Ajouter 10 ml de bichromate de potassium (1 N).

- Ajouter 20 ml de l'acide sulfurique concentré.

- Laisser reposer 30 mn.

- Ajouter 200 ml d'eau distillée.

- Ajouter 10 ml de l'acide phosphorique concentré.

- Ajouter 10 à 15 gouttes de l'indicateur coloré diphénylamine.

- Titrer avec le sulfate de per d'ammonium jusqu'à l'apparition d'un couleur vert.

Annexe 02. Analyses mycologiques.**Milieu PDA** (potato dextrose agar).**Composition de milieu de la culture PDA pH 5.6± 0,2.**

Pommes de terre.....	200 g
Glucose.....	20 g
Agar.....	15 g
Eau	1000 ml
Gentamicine.....	50ppm
Acide lactique.....	gouttes

Préparation du lactophénol.

Acide lactique	100ml
Phénol.....	100ml
Glycérol.....	100ml
Eau distillée.....	100ml

Annexe 03. Mise en évidence de l'activité enzymatique**Milieu gélose gélatinée** pH 6± 0,2

Gélatine	2g
Agar.....	9g
Eau distillée.....	500ml

Milieu à base de lait gélosé à 30 %.

Agar.....	15 g
Lait écrémé.....	30 ml
Eau distillée.....	1000ml

Après la préparation de l'agar blanc (agar + eau distillée) et pour la désinfection bactérienne, 50 ppm de gentamycine est ajouté. Après la stérilisation de ce milieu (une heure dans une cocotte-minute), 30 ml de lait écrémé (Candia 0% graisse) est ajouté à 70 ml d'agar blanc pour avoir la concentration de 30%.

Milieu PDA à 1% d'amidon pH 6± 0,2

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

❖ Stérilisation à 110°C pendant 30 minutes.

Milieu CMC-agar pH=5

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

❖ Stérilisation à 120°C pendant 20 minutes

Milieu Pectine-agar pH 7

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

❖ stérilisation à 110°C pendant 30 minutes

Milieu à base d'huile d'olive

Huile d'olive.....	2.5ml
Agar.....	2.2g
Eau distillée.....	100ml

Annexe 04. Indicateurs colorés.**Rouge Congo à 0.1%**

Rouge Congo.....0.1g

Eau distillé.....100ml

- ❖ 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 cuivre.....7.5g

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 chlorure de mercure.

HgCl.....15g

HCl concentré.....20 ml.

Eau distillée.....100ml

Chlorure de sodium de 1 M

Chlorure de sodium.....5.8g

Eau distillée.....100ml

المخلص

بهدف عزل الفطريات الخيطية من وسط شديد واختبار إنتاجها للهيدرولاز ، تم جمع 9 عينات من التربة المحيطة لشط ملغيع. حيث أظهرت التحليلات الفيزيائية والكيميائية التي أجريت للعينات التي تم فحصها ان متوسط درجة الحموضة يقدر ب(من 7الى8) ، والموصلية الكهربائية قدرت 24.4 و67.2 مللي / سم ، مع محتوى المواد العضوية 0.646%. أسفرت العزلة التي تُوّديها طريقة العزل في PDA عن عزل 16 عزلة من الفطريات الخيطية. وكشف تصنيف المورفولوجية عن هيمنة الفطريات الصبغية من جنس *Aspergillus et Penicillium* . وأظهر التوضيح لنشاط التحلل المائي الذي تم اختباره على وسط صلب أن لكل عزلة نشاط واحد على الأقل من الأنشطة التي تم اختبارها مع هيمنة المحللة للبروتين (81.25%) ونشاط الاميلاز (68.75%) ، نشاط التحلل للليباز يوجد فقط عند عزلة واحدة من مجموع العزلات التي تم فحصها. **الكلمات المفتاحية:** الفطريات الخيطية ،الهيدرولاز ، وسط شديد ،شط ملغيع ،التربة .

Résumé

Dans le but d'isoler des champignons filamenteux à partir d'un milieu extrême et de tester leur production en hydrolases, 9 échantillons ont été collecté du sol environnant Chott Melghir. Les analyses physicochimiques effectuées ont montré que les échantillons examinés sont en moyenne un pH alcalin (de 7 à 8), une conductivité électrique de 24.4 à 67.2 ms/cm, avec un taux de matière organique de 0.646%. L'isolement effectué par la méthode de suspension-dilution sur PDA a permis d'obtenir 16 isolats de champignons filamenteux. Leur identification morphologique (macroscopique et microscopique) a révélé la dominance des mycètes mélanisés, le genre *Aspergillus et Penicillium*. La mise en évidence de l'activité hydrolytique testée sur milieu solide a montré que chaque isolat possède au moins l'une des activités testées avec la dominance de l'activité protéolytique (81.25%, %) et amylolytique (68.75%), l'activité lipolytique n'a présenté que dans un seul isolat du total des isolats examinés.

Mots clés : champignons filamenteux, hydrolases, milieu extrême, sol, Chott Melghir.

Abstract

In order to isolate filamentous fungi from an extreme medium and to test their production in hydrolases, soil were collected from the soil surrounding Chott Melghir. The physicochemical analyzes carried out showed that the samples examined are on average an alkaline pH (7 to 8), an electrical conductivity of 24.4 and 67.2 ms/cm, with an organic matter content of 0.646%. The isolation carried out by the suspension-dilution method on PDA made it possible to obtain 16 isolates of filamentous fungi. Their morphological identification (macroscopic and microscopic) revealed the dominance of melanized fungi *Aspergillus and Penicillium*. Demonstration of the hydrolytic activity tested on solid medium showed that each isolate has at least one of the activities tested with the dominance of the proteolytic (81.25%) and amylolytic activity (68.75%), the lipolytic activity reported that in one isolate of the total isolates examined.

Key Words: filamentous fungi , hydrolases, extreme environment , soil, Chott Melghir