



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 :  
Farida SALEM

Le : mardi 9 juillet 2019

### Thème

**Profil des enzymes hydrolytiques des  
champignons filamenteux isolés d'un milieu  
extrême (Chott Tigudidine).**

---

#### Jury :

M.	Fathi BENBELAID	MCB	Université de Biskra	Président
Mme.	Wassila DENDOUGA	MCB	Université de Biskra	Rapporteur
M.	Fateh GUEMMAZ	MAA	Université de Biskra	Examineur

Année universitaire : 2018 - 2019

## **Remerciements**

*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*

***Mr. BENBELAID Fathi** en tant que président du jury.*

***Mr. GUEMMAZ Fateh** 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 « Abdo, Nani » et Mes chers sueurs « Karima, Hadjer, Fatima,  
Halima, Hiddi », que Dieu les garde et les protège.*

*A ma grande mère et mon grand père*

*A ma toute famille*

*A mes chères amies: Saliha, Haizia, Roumaissa, Fatima, Amel, Ibtissem, Adila,  
Houria, Aïcha, Hafsa, Amina, Khadija, Belkis, Amira, Razika.*

*A toute la promotion 2019*

*FARIDA.*

# **Sommaire**

# Sommaire

Sommaire .....	
Liste des tableaux .....	<b>I</b>
Liste des figures.....	<b>II</b>
Liste des abréviations .....	<b>III</b>
Introduction .....	1

## Première partie : PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

### Chapitre 1 : Les milieux extrêmes et les champignons filamenteux

1.1. Environnements extrêmes et les extrêmophiles .....	2
1.1.1. Environnement extrême.....	2
1.1.2. Extrêmophiles.....	2
1.2. Champignons filamenteux.....	
1.2.1. Définition.....	2
1.2.2. Morphologie et structure .....	2
1.2.3. Classification .....	3
1.2.4. Modes de reproductions des champignons filamenteux.....	3
1.2.4.1. Reproduction sexuée .....	3
1.2.4.2. Reproduction asexuée :.....	4
1.2.5. Condition de la croissance.....	4
1.2.5.1. Facteurs physicochimiques.....	4
1.2.5.2. Les besoins nutritifs.....	4
1.2.6. Les champignons extrêmophiles .....	5
1.2.6.1. Champignons thermophiles .....	5
1.2.6.2. Champignons Halophiles.....	5
1.2.6.3. Les alcalophiles .....	5
1.2.6.4. Les acidophiles .....	5
1.2.6.5. Champignons Xérophiles .....	6
1.3. Application biotechnologiques des extrêmophiles.....	6
Chapitre 2 : Les enzymes extrêmophiles	
2.1. Les enzymes extrêmophiles .....	7

2.1.1. Généralité : .....	7
2.1.2. Protéase .....	7
2.1.3. Les $\alpha$ -amylases .....	7
2.1.4. Les cellulases.....	8
2.1.5. Lipase .....	8
2.1.6. Pectinase.....	9

## DEUXIEME PARTIE : PARTIE EXPERIMENTALES

### Chapitre 3 : Matériels et Méthodes

3.1. Présentation de la région d'étude .....	10
3.2. Échantillonnage.....	10
3.2. Analyses physico-chimiques .....	11
3.2.1. Mesure du pH du sol .....	11
3.2.2. Conductivité électrique.....	11
3.2.3. Détermination du taux d'humidité.....	11
3.2.4. Dosage de chlorure .....	12
3.2.5. Dosage du carbone et matière organique.....	12
3.3. Analyses mycologiques.....	12
3.3.1. Préparation du milieu de culture.....	12
3.3.2. Préparation des suspensions- dilutions .....	12
3.3.1. Ensemencement des moisissures.....	13
3.3.2. Purification .....	13
3.3.3. Identification .....	13
3.3.3.1. Identification macroscopique .....	13
3.3.4.2. Identification microscopique.....	13
3.3.4. caractérisation physiologique vis-à-vis la salinité.....	14
3.3.4. Mise en évidence des activités enzymatiques extracellulaires .....	14
3.3.4.1. Protéase.....	14
3.3.4.2. Amylase .....	14
3.3.4.3. Cellulase .....	14
3.3.4.4. Pectinase.....	14
3.3.4.5. lipase.....	15

### Chapitre 4 : Résultats et discussions

4.1. Analyses physico-chimiques du sol .....	16
4.2. Isolement .....	18

4.3.1. Identification macroscopiques .....	18
4.3.2. Identification microscopique .....	20
4.4. Caractérisation physiologiques vis-à-vis la salinité .....	24
4.5. Mise en évidence de l'activité hydrolytique .....	
4.5.1. Gélatinase .....	25
4.4.2. Caséinase .....	26
4.4.3. Amylase.....	27
4.4.4. Cellulase .....	28
4.4.5. Pectinase.....	29
4.4.6. Lipase .....	30
Conclusion.....	31
références bibliographiques.....	32
Annexes	
Résumés	

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1.</b> Analyses physicochimiques du sol collecté de Chott Tighdidine.....	16.
<b>Tableau 2.</b> Observations quotidiennes de l'ensemencement des différentes dilutions du sol sur PDA.....	17.
<b>Tableau 3.</b> Identification macroscopique des isolats obtenus.....	18.
<b>Tableau 4.</b> Identification microscopique des isolats obtenus.....	20.
<b>Tableau 5.</b> La tolérance des isolats vis-à-vis la salinité.....	23.

## Liste des figures

<b>Figure 1.</b> Localisation géographique (Chott Tigudidine).....	10.
<b>Figure 2.</b> Chott Tigudidine (Photo original).....	10.
<b>Figure 3.</b> Différents étapes de l'échantillonnage.....	11.
<b>Figure 4.</b> Caractérisation physiologique sur PDA 10 %.....	24.
<b>Figure 5.</b> Caractérisation physiologique sur PDA 17.5 %.....	24.
<b>Figure 6.</b> Mise en évidence de gélatinase sur gélose gélatinée.....	25.
<b>Figure 7.</b> Diamètre de la zone d'hydrolyse (mm) de gélatine.....	25.
<b>Figure 8.</b> Mise en évidence de caséinase sur milieu à base de lait gélosé.....	26.
<b>Figure 9.</b> Diamètre de la zone d'hydrolyse (mm) de caséinase.....	26.
<b>Figure 10.</b> Mise en évidence de l'activité amylolytique.....	27.
<b>Figure 11.</b> Diamètre de la zone d'hydrolyse (mm) de l'amylase.....	27.
<b>Figure 12.</b> Mise en évidence de l'activité cellulolytique.....	28.
<b>Figure 13.</b> Diamètre de la zone d'hydrolyse (mm) de cellulase.....	28.
<b>Figure 14.</b> Mise en évidence de l'activité pectinolytique.....	29.
<b>Figure 15.</b> Diamètre de la zone d'hydrolyse (mm) de pectinase.....	29.
<b>Figure 16.</b> Mise en évidence de l'activité lipolytique.....	30.

## Liste des abréviations

- ❖ **PH** : poids humide.
- ❖ **PS** : poids sec.
- ❖ **H** : humidité
- ❖ **n** : volume de nitrate d'argent ( $\text{AgNO}_3$ ) mesuré après titrage.
- ❖ **n'** : volume de nitrate d'argent ( $\text{AgNO}_3$ ) prendre pour le titrage.
- ❖ **V** : volume de filtrat.
- ❖ **v** : volume d'échantillon.
- ❖ **P** : poids du sol 1.
- ❖ **CO** : carbone organique.
- ❖ **MO** : matière organique.
- ❖ **B** : le volume de la solution consommée.
- ❖ **A** : le volume de la solution consommé par le témoin.
- ❖ **PDA**: Potato dextrose agar.

# **Introduction**

# Introduction

Le sol constitue un bon environnement pour la prolifération microbienne, dans lequel, les champignons filamenteux représentent la biomasse majoritaire après les bactéries (Calvet, 2000). Le nombre, la composition et la diversité des espèces dans un sol donné dépendent de nombreux facteurs, notamment l'aération, la température, l'acidité, l'humidité, la teneur en éléments nutritifs et en substrat organique (Marilley *et al.*, 2007).

Les champignons filamenteux peuvent également habiter dans des environnements extrêmes, où les conditions de vie sont particulières; la température et la salinité élevées, le pH très acides ou très alcalin, représentent des facteurs écologiques déterminant d'un milieu extrême et une source importante à exploiter pour développer des nouveaux procédés biotechnologiques (Bhat, 2000 ; Peciulyte, 2007). Les champignons filamenteux peuvent synthétiser un grand nombre de substances complexes économiquement très importantes, telles que ; les acides organiques, les antibiotiques et les enzymes (Vierling, 2008).

Les enzymes produites par les champignons filamenteux extrêmophiles sont nommées extremoenzymes, représentant des propriétés et des spécificités diverses. Ces propriétés reflètent de plus en plus leurs utilisations dans divers domaines d'applications, tels que l'industrie alimentaire, les détergents pour lessives, l'industrie des tanneries et l'industrie pharmaceutique. Les enzymes de la famille des hydrolases telles que, l' $\alpha$ -amylase, la cellulase, la pectinase, protéase, lipase, sont parmi les enzymes les importantes à l'échelle industrielle (Little, 2004).

Dans ce cadre, le présent travail est réalisé, dont l'objectif principal est d'isoler des champignons filamenteux avec des caractéristiques d'intérêt industriel et de tester leur production en hydrolases. Pour atteindre notre objectif, notre travail est organisé en cinq étapes ;

1. Echantillonnage à partir du sol de Chott Tigudidine, choisi comme milieu extrême ;
2. Analyses physicochimiques des échantillons du sol ;
3. Isolement et identification morphologique des champignons filamenteux ;
4. Caractérisation physiologique des isolats obtenus vis-à-vis de la salinité ;
5. Mise en évidence de l'activité hydrolytique.

**Première partie**  
**Partie bibliographique**

# **Chapitre 1**

# **Environnements extrêmes et les champignons filamenteux**

## **1.1. Environnements extrêmes et les extrémophiles**

### **1.1.1. Environnement extrême**

Pour pouvoir définir un environnement extrême, il faudrait d'abord définir ce qu'est un environnement non-extrême ou normal. Pour cela, un consensus général établit les facteurs physiques et chimiques les plus importants pour un environnement normal. Ces facteurs se situeraient approximativement à des valeurs de température de 4 à 50°C, de pH de 5 à 8,5 et de salinité entre celle de l'eau douce et celle de l'eau de mer. Loin des environnements normaux, la diversité des espèces diminue et le stress environnemental augmente. Les facteurs de stress environnementaux sont habituellement additifs, l'augmentation d'un facteur, augmente la susceptibilité du microorganisme envers d'autres facteurs (Kristjansson et Hreggvidsson, 1995).

### **1.1.2. Extrémophiles**

Sont des micro-organismes qui se développent de manière optimale dans des conditions de milieux mortelles pour la quasi-totalité des autres espèces. Le concept d'extrémophilie à la différence de celui de résistance aux conditions extrêmes, implique que l'ensemble de la machinerie cellulaire soit adapté aux conditions extrêmes et que les cellules fonctionnent de manière optimale dans ces conditions (Querellou et Guezennec, 2010).

## **1.2. Champignons filamenteux**

### **1.2.1. Définition des champignons filamenteux**

Les moisissures ou les champignons filamenteux sont des eucaryotes non photosynthétiques (Guiraud, 1998). Ils peuvent être définis comme des microorganismes hétérotrophes filamenteux et immobiles (Nicklin *et al.*, 2000). Ils appartiennent à l'embranchement des thallophytes (Semal *et al.*, 1993). Les champignons filamenteux sont des organismes ubiquitaires, on les trouve dans le sol, l'air, sur les revêtements de l'homme, des animaux, des plantes (Figarella *et al.*, 2007). Certains vivent en symbiose avec les végétaux (Nicklin *et al.*, 2000), d'autres sont des parasites des végétaux ou des animaux, d'autres sont des saprophytes, se développant sur des déchets organiques (Dedet, 2007).

### **1.2.2. Morphologie et structure des champignons filamenteux**

La cellule de champignon compose les différents organites d'une cellule eucaryote (noyau, mitochondries, réticulum endoplasmique, l'appareil de Golgi, ribosomes, et paroi ... ) (Rebbouh, 2016).

Le corps ou thalle d'une moisissure est fait 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). Chez la plupart des moisissures, les hyphes sont divisés par les cloisons où 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 coénocytes (Tortora *et al.*, 2003).

### 1.2.3. Classification des champignons filamenteux

La classification des moisissures est basée sur des caractéristiques morphologiques (aspect des hyphes) (Castegnaro et Pfohl, 2002), et physiologiques (mode de reproduction), on distingue quatre classes : les Zygomycètes ; les Ascomycètes, les Basidiomycètes, et les Deutéromycètes (Marie *et al.*, 2002).

\* **Zygomycètes** : Ce sont des moisissures, dont les hyphes sont cénocytiques (non segmentés), ils sont appelés également les mycètes à conjugaison. Leur reproduction sexuée donne des zygospores. (Leyral et Vierling, 2007).

\* **Ascomycètes** : ou mycètes à sac, regroupent les moisissures à hyphes segmentés, donc le caractère distinctif des Ascomycètes est l'asque ; structure en sac dans laquelle se forment les spores méiotiques (sexuées), nommées également ascospores (Raven *et al.*, 2003).

\* **Basidiomycètes** : ou mycètes à massue, ou appelés encore les champignons à chapeau, se caractérisent par des hyphes segmentés et la formation des basides impliqués dans la reproduction sexuée (Prescott *et al.*, 2003).

\* **Deutéromycètes** : sont communément connus comme des mycètes imparfaits. Ils sont des Ascomycètes ou Basidiomycètes qui ont perdu la partie sexuée de leur cycle biologique (Perry *et al.*, 2004).

### 1.2.4. Modes de reproductions des champignons filamenteux

La multiplication ou la reproduction des moisissures se fait sous forme de spores selon deux mécanismes: sexué et asexué. (Gansen et Alexandre, 2004).

#### 1.2.4.1. Reproduction sexuée

La reproduction sexuée est assurée par des gamètes ou des spores formées à la suite d'une méiose (Sterullu, 1991). Selon Tortora *et al.*, (2007) elle se résume donc en trois phases :

- a- Plasmogamie: phase où se réalise la fusion protoplasmique.
- b- Caryogamie: les noyaux plus et moins fusionnés forment le noyau diploïde d'un zygote.
- c- Méiose : le noyau diploïde donne naissance à des noyaux haploïdes (spores sexuées).

### 1.2.4.2. Reproduction asexuée

Les spores représentent le mode de reproduction asexué le 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).

### 1.2.5. Condition de la croissance

#### 1.2.5.1. Facteurs physicochimiques

\* **La température** : Elle joue un rôle prépondérant dans la croissance mycélienne, elle intervient également dans la sporulation et la germination des spores (Bourgeois, 1989). La plupart des mycètes sont mésophiles et croissent à des températures variant de 5 à 40°C (Delarras, 2008). Certains sont psychrophiles et sont capables de vivre à moins de 5°C, d'autres sont thermotolérants ou thermophiles et peuvent croître au-dessus de 50°C (Nicklin *et al.*, 2000).

\* **L'humidité** : L'influence de l'humidité se manifeste sur la croissance du mycélium, la sporulation et leur germination (Leyral et vierling, 2007). Cependant, la majorité des moisissures préfèrent une activité en eau plus élevée de 0,80 à 0,95 voire même parfois la saturation à 25°C, quelques espèces (xérophiles) peuvent croître à une activité en eau  $A_w < 0,75$  (Guiraud, 2003).

\* **Le PH** : La croissance optimale des champignons filamenteux se fait à des pH entre 4 et 6, 5, bien qu'ils peuvent tolérer des pH très acides et des pH alcalin (Delarras, 2008).

\* **La lumière** : Les radiations du spectre visible (380 – 720) n'ont en général pas d'action sur la croissance végétative des champignons mais peuvent agir sur la sporulation (Botton *et al.*, 1999).

\* **Aération** : La quantité d'oxygène mise à la disposition des moisissures est un facteur important de développement (Botton *et al.*, 1999). La plupart sont aérobies, certaines peuvent même supporter une anaérobiose très stricte (Madigan et Martinko, 2007).

#### 1.2.5.2. Les besoins nutritifs

\* **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. (Nicklin *et al.*, 2000).

\* **L'azote** : La plupart moisissures utilisent comme source d'azote les nitrates ou les sels ammoniacaux mais aussi les acides aminés (Leyral et Vierling, 2007), et aucune moisissure ne peut fixer l'azote atmosphérique (Devet, 1997).

\* **Éléments minéraux** : La présence des ions minéraux et métaux dans le milieu de culture est nécessaire pour la croissance et la reproduction de plusieurs espèces fongiques, il

s'agit essentiellement de sulfate, de magnésium, de potassium, de sodium et de phosphore avec des concentrations plus ou moins différentes selon l'espèce (Uchicoba *et al.*, 2001).

\* **L'eau** : Elle assure, pour les champignons la diffusion des substances nutritives dans les cellules, la libération des enzymes extracellulaires et la maintenance de leur cytoplasme. La disponibilité en eau était définie par l'équilibre de l'humidité relative (HR) que doivent être 70% (Nasraoui, 2006).

\* **Vitamine** : Diverses vitamines sont également d'une grande importance pour leur croissance, en particulier la thiamine, la biotine intervenant comme coenzyme lors des carboxylations (Botton *et al.*, 1990).

### **1.2.6. Les champignons extrémophiles**

Même, si toute matière organique peut constituer un substrat de croissance pour les moisissures, les conditions optimales de croissance peuvent varier d'une espèce à l'autre, Chacune d'entre elles ayant un degré différent d'adaptation à son environnement (Halewyn *et al.*, 2002), donc on a :

#### **1.2.6.1. Champignons thermophiles**

Un champignon est considéré comme thermophile lorsque les températures limites de sa croissance sont situées entre 45°C et plus de 80 °C. Alors qu'un champignon est considéré hyperthermophiles lorsqu'il se développe au-dessus 80 °C (Madijan et Martino ,2006) D'après Salar et Aneja 2007, il existe jusqu'à présent 42 espèces de champignons filamenteux thermophiles décrits, avec cinq espèces appartenant aux Zygomycètes, vingt-trois aux Ascomycètes et quatorze aux Deutéromycètes.

#### **1.2.6.2. Champignons Halophiles**

Les champignons halophiles sont définis comme étant ceux capables de pousser plus rapidement sur des milieux contenant du NaCl que sur ceux contenant du glucose ou du fructose et ceux-ci à des activités en eau (Aw) comprises entre 0,80 et 0,90 et à des températures de 20, 30, 34 et 37 °C. Ils peuvent être classés selon le degré de leur besoin en sel (Pitt et Hocking ,2009).

#### **1.2.6.3. Alcalophiles**

Sont des microorganismes qui se développent de façon optimale à pH supérieur à 9,0, souvent avec un pH optimum autour de 10, tout en montrant la croissance peu ou pas près des valeurs de pH neutres (Horikoshi, 1999). Une diversité de microorganismes peut croître à un pH de 10,5 (Martins *et al.*, 2001).

#### **1.2.6.4. Acidophiles**

Sont des microorganismes qui se développent de façon optimale à un pH de 2 (Morozkina *et al.*, 2010). Les acidophiles oxydent le soufre élémentaire (dans les zones volcaniques) ou les minéraux sulfurés (en drainage) pour obtenir de l'énergie, générant ainsi des milieux acides extrêmes (Rohwerder et Sand, 2007).

#### **1.2.6.5. Champignons Xérophiles**

Selon Pitt, (1975) les champignons xérophiles se définissent comme étant des champignons capables de pousser à des activités en eau ( $A_w$ ) inférieures à 0,85. De son côté Griffin, (1981) divisa ce groupe de champignons en Xérophiles ayant un optimum de croissance à une activité en eau  $A_w$  inférieure à 0,96 et en Xérotolérants avec un optimum de croissance à des  $A_w$  comprises entre 1,00 et 0.96.

### **1.3. Application biotechnologiques des extrémophiles**

On peut distinguer deux types d'applications différentes. La première repose sur l'utilisation directe des organismes. C'est le cas en particulier pour les applications liées à la bioremédiation (ensemble des procédés visant à la restauration d'un écosystème grâce à la stimulation des populations microbiennes indigènes ou à l'apport de populations adaptées) et à la biolixiviation (ou procédé dans lequel les microbes sont utilisés pour le traitement des minerais). Le second type d'applications repose sur l'utilisation des biomolécules issues des extrémophiles. Ce sont en particulier les enzymes, mais aussi les protéines, les lipides, les polymères, les extrêmolytes et une grande diversité de métabolites secondaires (Querellou et Guezennec, 2010).

## **Chapitre 2**

# **Les enzymes extrêmophiles**

## 2.1. Les enzymes extrêmophiles

### 2.1.1. Généralité :

À savoir les extremozymes, à l'aide d'une grande stabilité et d'un risque de contamination réduite des organismes qui les produite. D'autres caractéristiques utiles de ces enzymes au cours du processus de production comprennent des vitesses de transfert améliorées et une viscosité inférieure. En raison de propriétés particulière de ces enzymes, elles devraient constitués le pont entre les processus biologique et chimique. Les développements récents sont maintenant les bons catalyseurs de grand intérêt industriel. Des exemples typiques sont les enzymes dégradant les polymères comme : amylase, protéase, cellulase... (Querellou et Guezennec, 2010).

### 2.1.2. Protéase

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). Elles sont générées comme des pro-enzymes inactives (zymogènes) et selon les exigences, elles seront converties en forme active par une protéolyse limitée (Reddy et *al.*, 2008).

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

Les protéases sont généralement utilisées comme additifs dans les détergents de blanchisserie, dans la transformation des produits alimentaires, pharmaceutiques et dans les industries de tannage de cuir aussi bien que dans la gestion des déchets (Amoozegar et *al.*, 2007).

### 2.1.3. $\alpha$ -amylases

L' $\alpha$ -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' $\alpha$ -dextrines. (Souza, 2010).

La production industrielle de ces enzymes à partir des microorganismes fongiques appartenant surtout aux genres *Aspergillus* et *Penicillium*, existe depuis longtemps. L' $\alpha$ -amylase fongique est d'une thermostabilité assez faible, son optimum d'action se situe entre 50°C et 55°C (Duo-Chuan et *al.*, 1997). Actuellement d'autres genres de moisissures dont *Rhizopus* et

*Alternaria* ont été utilisés pour la production d' $\alpha$ -amylase relativement thermostable (Kaki *et al.*, 2012).

Les  $\alpha$ -amylases sont une classe importante d'enzymes industrielles, avec des applications à grande échelle dans l'industrie alimentaire, textile, papier, détergent et pharmaceutique. L'activité et la stabilité de ses enzymes sont maintenues dans divers solvants organiques tels que le xylène, le styrène, le toluène, le benzène et le chloroforme. (Kumar *et al.*, 2016).

#### 2.1.4. 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  $\beta$  (1-4)-glucanase ou endocellulase, Exo  $\beta$  (1-4)-glucanase ou cellobiohydrolase,  $\beta$  (1-4)-glucosidase ou cellobiase (wang *et al.*, 2002).

Les moisissures occupent une place importante sur le marché des cellulases dont les productrices principales sont les *Aspergillus* et les *Trichoderma*. Ces champignons filamenteux sont les plus connus et les plus efficaces pour la dégradation des polysaccharides des parois cellulaires végétales, en produisant des mélanges d'enzymes hydrolytiques extracellulaires (Hasper *et al.*, 2002).

La biotechnologie des cellulases a débuté vers les années 1980 dans l'alimentation animale (Chesson, 1987), et ensuite dans l'industrie du textile, de la lessive et du papier. Actuellement, elle occupe environ 20 % du marché mondial des enzymes (Lekchiri *et al.*, 2006). Les performances élevées atteintes leurs ouvrent des perspectives intéressantes pour différentes applications industrielles (leglimi, 2013), dans les industries de transformation de l'amidon, de brasserie, l'extraction de jus de fruits et légumes (Gao *et al.*, 2008). L'intérêt aux cellulases augmente également dans la production du bioéthanol (Wang *et al.*, 2009).

#### 2.1.5. Lipase

Les lipases sont définies comme étant des carboxyle-estérases catalysant l'hydrolyse et la synthèse d'esters formés de glycérine et des acides gras de longues chaînes (Reis *et al.*, 2008). Ils ressemblent aux estérases, mais elles se diffèrent par leur capacité d'agir sur les esters insolubles dans l'eau (Petersen et Daniel, 2006).

Les lipases microbien sont également largement répandues chez les champignons filamenteux tels que, *Aspergillus flavus*, *A.oryzae*, *A.parasiticus*, *Penicillium roqueforti*, (Fickers *et al.*, 2007). La quantité de lipases produites par des champignons dépend de plusieurs facteurs environnementaux tels que; la température d'incubation, le pH, les sources de carbone, d'azote ... (Aires-Barros *et al.*, 1994).

Indépendamment de leur importance biologique, les lipases ont un rôle important dans divers secteurs : médecine clinique, pharmacologie, nutrition, aliments et technologie des huiles (Verger *et al.*, 1990). Notamment, la grande majorité des préparations commerciales des lipases concernent les lipases d'origine fongique (Smeltzer *et al.*, 1992).

#### **2.1.6. Pectinase**

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, qui représentent le polysaccharide majeur de la paroi cellulaire primaire et la lamelle moyenne de la paroi végétale. Cette action se résume dans le scindement de l'acide polygalacturonique (PGA) en acide monogalacturonique (Tatiana et Flevo, 2005).

Les enzymes pectinolytiques d'origine fongique occupent une position centrale avec 25% du marché global des enzymes (Sharma *et al.*, 2013), leur production industrielle est réalisée principalement par fermentation en milieu solide. Les microorganismes utilisés sont des champignons filamenteux de trois genres différents : *Aspergillus*, *Penicillium* et *Botrytis*.

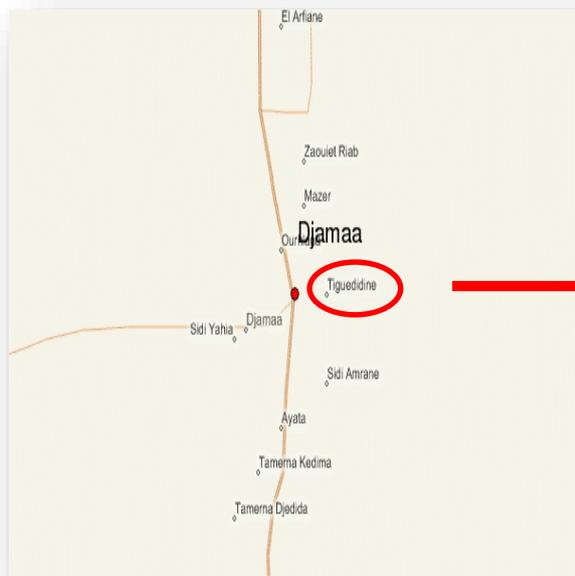
Les pectinases trouvent des applications dans divers domaines tel que : le textile, industries du papier, fermentation du cacao, la confection et la maturité du thé, l'extraction des pulpes à partir des fruits et légumes, ainsi que le traitement des eaux usés (Zeni *et al.*, 2015). Elles sont utilisées également dans la clarification du vin, ou bien comme complément alimentaire dans l'alimentation animale (Rodriguez-Fernández *et al.*, 2011).

# **Chapitre 3**

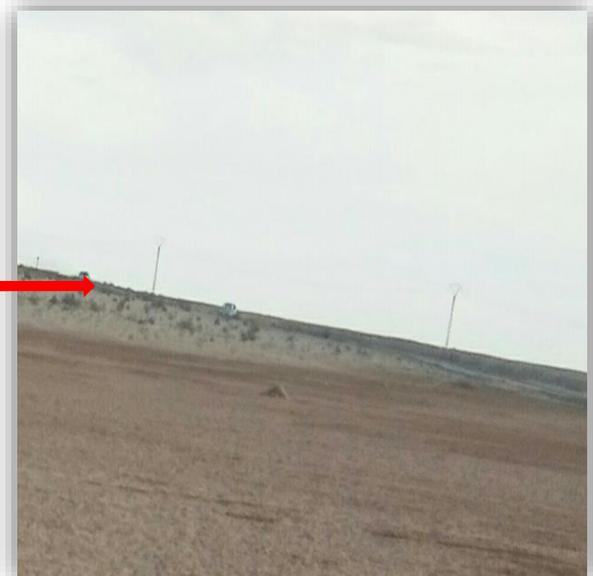
## **Matériel et Méthodes**

### 3.1. Présentation de la région d'étude

Les échantillons du sol sont prélevés à partir de Chott Tigudidine situé dans la région d'Oued Righ à Djamaa lié administrativement à la wilaya d'Oued Souf présentée une carte géographique de l'Algérie. Il est limitée par : Tébessa et khenchela au Nord, Ouargla au Sud, la Tunisie a l'Est, Ouargla et Djelfa à l'Ouest (01). La vallée d'Oued Righ se situe au Nord- Est du Sahara Algérie, le long du grand Erg oriental et au sud de l'Aurès. Elle se présente comme une sorte de gouttière très aplatie de 15 à 30 Km de large et s'étend sur 150 Km, sur un axe Sud-Nord entre les latitudes  $32^{\circ} 45'$  -  $34^{\circ} 30'$  et les longitudes  $5^{\circ} 45'$  et  $6^{\circ} 15'$  Est (Boumaraf *et al.*, 2014). Le climat de cette région est extrêmement aride, avec une précipitation irrégulière variée entre 80 et 100 mm/ans. La température annuelle moyenne est de  $23^{\circ}\text{C}$ ; le mois le plus froids est janvier ( $08^{\circ}\text{C}$ ) et le mois le plus chaud est juillet ( $40^{\circ}\text{C}$ ). (Dendouga *et al.*, 2015).



**Figure 1.** Localisation géographique (Chott Tigudidine) (2).



**Figure 2.** Chott Tigudidine (Photo original).

### 3.2. Échantillonnage

Les 07 échantillons du sol ont été pris le 25/1/2018 à une profondeur de 10 cm, dont les 5 premiers cm superficiels ont été écartés. Chaque échantillon est recueilli par une spatule stérile et posé dans un flacon en verre stérile. Le long de notre travail on a pris les précautions d'usage des désinfections des outils (Par l'alcool éthylique) pour éviter tout risque de contamination entre les échantillons (Davet et Rouxel, 1997). L'ensemble des échantillons collectés pour les

analyses microbiologiques et physicochimiques est transporté au laboratoire, où ils ont été conservés à 4°C.



**Figure 3.** Différentes étapes d'échantillonnage.

## 3.2. Analyses physico-chimiques

### 3.2.1. Mesure du pH du sol

Pour la mesure de pH du sol de nos échantillons, on commence par la préparation d'une suspension du sol (20g du sol avec 100 ml d'eau distillée). Une agitation pendant 45 min pour l'obtention d'une suspension homogène, Le pH de sol pour chaque échantillon a été déterminée à l'aide d'un pH mètre (Aubert, 1978).

### 3.2.2. Conductivité électrique

La mesure de la conductivité électrique de nos échantillons du sol nécessite la préparation d'un homogénat du sol (20g de chaque échantillon dilué dans 100 ml d'eau distillée), avec une filtration après une agitation de 30 min. Les mesures de la conductivité électrique des filtras obtenue, sont réalisées par conductimètre (Aubert, 1978).

### 3.2.3. Détermination du taux d'humidité

Sécher 1 g 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:

$$H (\%) = (PH-PS/PH) \times 100.$$

- ❖ PH : poids humide.
- ❖ PS : poids sec.
- ❖ H : humidité

### 3.2.4. Dosage de chlorure

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 e. le témoin est préparé en remplaçant le filtrat par l'eau distillée. La concentration du chlore est déterminée selon la formule suivante :  $Cl\ mg/l = [(n-n')\ 0,1\ V/v].100/p.$

**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.

### 3.2.5. Dosage 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.

## 3.3. Analyses mycologiques

### 3.3.1. Préparation du milieu de culture

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).

### 3.3.2. Préparation des suspensions- dilutions

Une quantité de 10 g de chaque échantillon du sol est suspendue dans 90 ml d'eau distillée stériles. Les suspensions du sol ont été vigoureusement agitées pendant 30 min. (Davet et Rouxel, 1997). De chaque suspension du sol, une série de dilution décimale est effectuée ( $10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}$ ) (Bonney *et al.*, 2002).

### 3.3.1. Ensemencement des moisissures

Le travail d'ensemencement a été pratiqué autour d'un bec bunsen. Un ml de chaque dilution est ensemencée dans une boîte de Pétri qui contient préalablement le PDA, l'homogénéisation est réalisée en agitant manuellement les boîtes d'un mouvement circulaire dans le plan horizontal. Ces derniers sont incubés à 30°C et sont observés quotidiennement pendant deux semaines (Davet et Rouxel ,1997) pour noter l'apparition de chaque colonie fongique.

### 3.3.2. Purification

Avant d'entamer l'identification, on procède à la purification des isolats à l'aide d'une série de repiquage (Botton *et al.*, 1990) donc chaque colonie de moisissure apparue a été repiquée au centre et individuellement dans une autre boîte de Pétri. Le milieu de culture utilisé pour la purification est le même utilisé pour l'isolement (PDA). Tous les isolats repiqués sont incubés à 30°C (Dendouga, 2006).

### 3.3.3. Identification

L'identification reste l'opération la plus difficile dans le domaine de la mycologie, elle a pour but de classer les souches fongiques par genres et espèces selon les critères d'identification (Botton *et al.*, 1990). Elle est effectuée par deux techniques classiques, une observation macroscopique et une étude microscopique.

#### 3.3.3.1. Identification macroscopique

Ce suivi réalisable à l'œil nu mais aussi grâce à une loupe binoculaire permet de rassembler des indices révélateurs sur l'identité de nos isolats (Leghlimi, 2013).

L'aspect des colonies : les colonies peuvent être duveteuses, laineuses, cotonneuses, veloutées, poudreuses ou granuleuse.

Le relief des colonies : les colonies peuvent avoir un aspect plat ou plissé.

La couleur des colonies : est un élément très important d'identification; les colonies peuvent être de couleur blanche, crème, jaune, orange, verte, brune allant jusqu'au noir. Les pigments peuvent être localisés au niveau du mycélium ou diffuser dans le milieu de culture (Diguta, 2010).

#### 3.3.3.2. Identification microscopique

Elle a été réalisée par la méthode de scotche ; un petit morceau de scotch est appliqué par la face collante sur la colonie à l'aide d'une pince, puis déposé sur une lame porte -objet (Chabasse *et al.*, 2002), on utilisant le réactif lactophénol (annexe 01) comme diluant (Botton *et al.*, 1990). L'examen microscopique est basé sur les caractères morphologiques, On notant

les types de spores, aspect du thalle, aspect, couleur et disposition des spores, conidies (Mouria *et al.*, 2012).

### **3.3.4. caractérisation physiologique vis-à-vis la salinité**

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 ensemencé par disque et incubée à 30°C pendant 7 jours. (Guiraud, 2003).

### **3.3.4. Mise en évidence des activités enzymatiques extracellulaires**

#### **3.3.4.1. Protéase.**

##### **a. Gélatinase**

La recherche d'une gélatinase est réalisée sur un milieu de base, additionné 0,4% de gélatine (Annexe 3). L'hydrolyse est révélée par l'addition de 1 à 2 ml du réactif de Frazier (annexe 04). Une zone claire indique la production d'une gélatinase (Gutierrez et Gonzalez, 1986).

##### **b. Caséinase**

L'hydrolyse de la caséine a été étudiée sur un milieu gélosé contenant 30% du lait écrémé (Annexe 02). L'hydrolyse des protéines du lait est indiquée par l'apparition d'une zone claire (Benkahoul *et al.*, 2017).

#### **3.3.4.2. Amylase**

La présence de l'activité amylolytique est déterminée qualitativement selon la méthode décrite par Amoozegar *et al.*, (2003), en utilisant le milieu de base additionnée de 1% d'amidon soluble (annexe 03). La lecture se fait après l'addition du lugol (annexe 04) qui réagit avec l'amidon pour donner la couleur bleu violacé (kaki, 2017).

#### **3.3.4.3. Cellulase**

Cette activité a été testée sur milieu de base supplémenté de 0,5% (p/v) de carboxyméthylcellulose (CMC) (annexe 03) (Benkahoul *et al.*, 2017). Après ensemencement et incubation, les boîtes ont été inondées avec une solution de rouge du Congo (annexe 04) pendant 15 min, puis a été lavée avec un chlorure de sodium de 1 M (annexe 04). Les zones non colorées indiquent l'hydrolyse de la cellulose (Korish, 2003).

#### **3.3.4.4. Pectinase**

Pour la sélection des souches productrices de pectinase. Le milieu pectine agar est utilisé (annexe 03). Après ensemencement et incubation, les boîtes sont inondées par une solution d'acétate de cuivre (annexe 03) pendant 10 minutes. Un résultat positif se traduit par un halo clair auteur de la colonie productrice (Benkahoul *et al.*, 2017).

**3.3.4.5. lipase**

Cette activité est recherchée sur milieu de base contenant 2,5% (v/v) d'huile d'olive (annexe 03). Après ensemencement et incubation, le développement d'un précipité autour des souches témoigne la présence d'une lipase (Ayad, 2011).

# **Chapitre 4**

## **Résultats et discussion**

#### 4.1. Analyses physico-chimiques du sol

Les analyses physicochimiques des différents échantillons du sol collectés de chott Tighdidine a permis d'obtenir les résultats présentés dans le tableau présenté ci-dessous.

**Tableau 1.** Analyses physicochimiques du sol collecté de Chott Tighdidine.

Echantillons	pH	CE (ms/cm)	H (%)	Cl <sup>-</sup> (mg/l)	MO (%)	CO (%)
E 1	8.12	17.6	10	103		
E 2	8.02	17.9	10			
E 3	7.77	18.01	10	107	0.43	0.18
E 4	7.64	19.75	13			
E 5	7.79	18.2	15			
E 6	8.64	20.1	0	111		
E 7	7.5	21.9	13			

Le sol de nos échantillons est alcalin, dont les valeurs de pH sont comprises entre 7.5 et 8.64. Selon la classification d'Aubert (1978), le sol de chott Tighdidine est considéré comme alcalin avec un pH supérieur à 7.5. Ce résultat est similaire aux études de Mendeel (2002), qui a signalé que les sols dans les zones arides et les régions semi-arides sont généralement alcalins.

La conductivité électrique de nos échantillons du sol est comprise entre 17.6 et 21.9, donc ils sont considérés comme des sols extrêmement salés selon Clément et Françoise (2009) et également Aubert (1978), qui ont classé le sol comme extrêmement salés si sa conductivité électrique est supérieure à 16 ms/cm.

Selon Lee et Hwang (2002) nos échantillons présentent une humidité variable entre faible (0 %) à modéré (10 à 13 %.)

L'analyse édaphique a montré également que les sols de nos échantillons se caractérisent par une prédominance des ions de chlorure.

L'analyse de la matière organique (MO) a permis de montrer un taux très faible avec une valeur de 0.18 (Lee et Hwang, 2002). Selon Benabadji (2002), la faible richesse en matière organique des sols des zones arides est due à la faible couverture végétale dans ces zones.

#### 4.1. Isolement

Les cultures des prélèvements sur milieu PDA ont permis l'obtention de 11 isolats différents de champignons filamenteux. Les résultats sont rassemblés dans le tableau présenté ci-dessous.

**Tableau 2 :** Observations quotidiennes de l'ensemencement des différentes dilutions du sol sur PDA.

Echantillons	Dilution	J1	J2	J3	J4	J5	J6	J7	J8	J9	J10
01	Solution mère	-	-	-	-	+	+	+	+	+	++
	10 <sup>-1</sup>	-	-	-	-	-	+	+	++	++	+++
	10 <sup>-2</sup>	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
	10 <sup>-3</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
02	Solution mère	-	+	+	+	+	+	+	+	++	+++
	10 <sup>-1</sup>	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
	10 <sup>-2</sup>	-	-	-	-	+	+	+	+	++	++
	10 <sup>-3</sup>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
03	Solution mère	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
	10 <sup>-1</sup>	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
	10 <sup>-2</sup>	-	-	+	+	+	+	+	+	++	++
	10 <sup>-3</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
04	Solution mère	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
	10 <sup>-1</sup>	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
	10 <sup>-2</sup>	-	-	+	+	+	+	+	+	+	++
	10 <sup>-3</sup>	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
05	Solution mère	-	-	+	+	+	++	++	++	++	++
	10 <sup>-1</sup>	-	-	+	+	+	+	+	++	++	+++
	10 <sup>-2</sup>	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
	10 <sup>-3</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
06	Solution mère	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	10 <sup>-1</sup>	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
	10 <sup>-2</sup>	-	-	-	-	+	+	+	++	++	++
	10 <sup>-3</sup>	-	-	+	+	+	+	+	++	++	+++
07	Solution mère	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	10 <sup>-1</sup>	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
	10 <sup>-2</sup>	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
	10 <sup>-3</sup>	-	-	-	+	+	+	++	++	++	++

J : jour, + : 10 isolats, ++ : 10-20 isolats, +++ : 20-30 isolats.

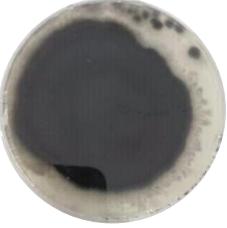
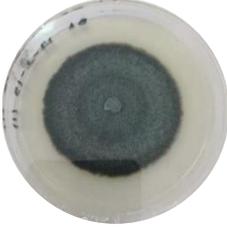
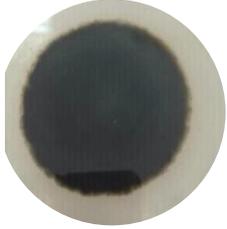
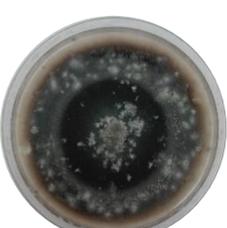
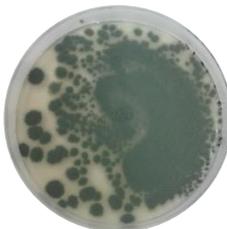
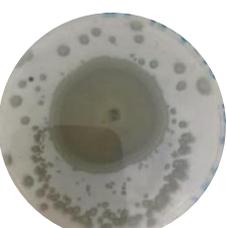
Selon ces résultats, on peut constater que la densité de la population fongique (moisissures) dans tous les échantillons du sol examinés est faible, où la majorité de nos isolats de moisissures sont obtenues de la solution mère. Ces résultats confirment les résultats des analyses physicochimiques, dont les milieux extrêmes présentent une faible biomasse microbienne. En effet, l'abondance des moisissures dans le sol et leurs diverses activités sont influencées par des facteurs abiotiques tels que le contenu du sol en matières organiques et sa texture, la température, le pH et l'humidité... (Dendouga *et al.*, 2015). Selon Grantina *et al.* (2011) une corrélation positive significative a été notée entre la population fongique et le pH du sol, dont les champignons préfèrent généralement un pH légèrement acide, bien qu'ils soient capables de croître dans un large éventail de pH. Jaouani *et al.*, (2014) ont trouvé une corrélation négative entre le chlorure et la densité de la population fongique, qui peut être justifiée par la teneur élevée en chlorure dépassant les besoins des microfungi. En outre, la pauvreté du sol en matière organique explique la faible densité des champignons Pendleton *et al.*, (2003).

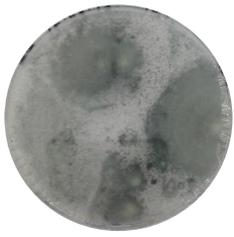
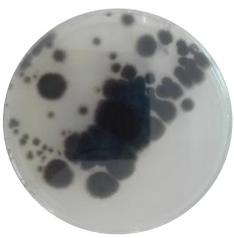
## 4.2. Identification morphologique

### 4.2.1. Identification macroscopiques

**Tableau 3.** Identification macroscopique des isolats obtenus.

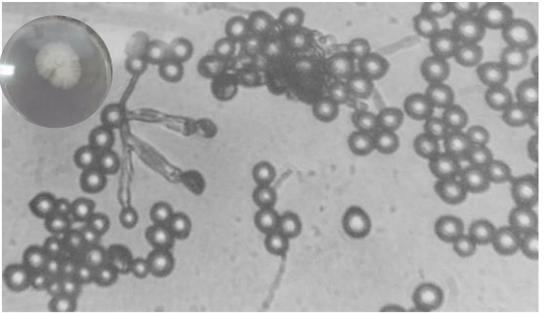
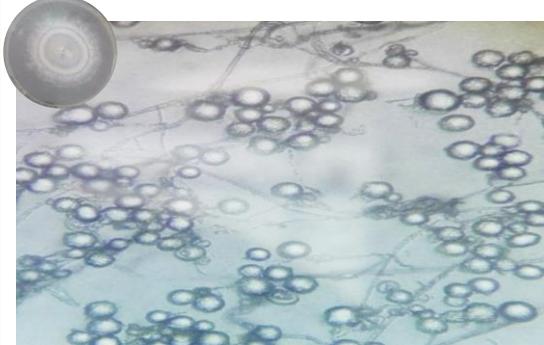
Codes	Recto	Caractère macroscopiques	Verso
B2 11/2 (4)		<b>Recto :</b> blanc claire. <b>Verso :</b> incolore. <b>Croissance :</b> moyenne. <b>Aspect :</b> velouté. <b>Relief de la colonie :</b> plat.	
B2 17/2 (3')		<b>Recto :</b> blanc. <b>Verso :</b> incolore. <b>Croissance :</b> moyenne. <b>Aspect :</b> velouté. <b>Relief de la colonie :</b> plat.	
B6 17/2 (3*)		<b>Recto :</b> blanc foncé. <b>Verso :</b> blanc à rose. <b>Croissance :</b> rapide. <b>Aspect :</b> duveteuse. <b>Relief de la colonie :</b> bombée.	

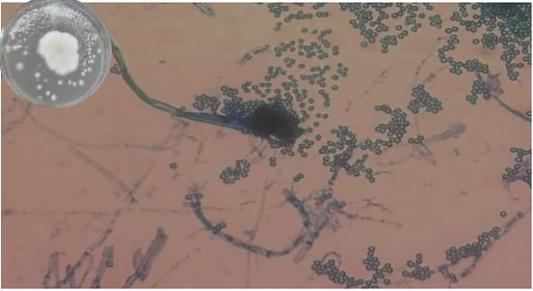
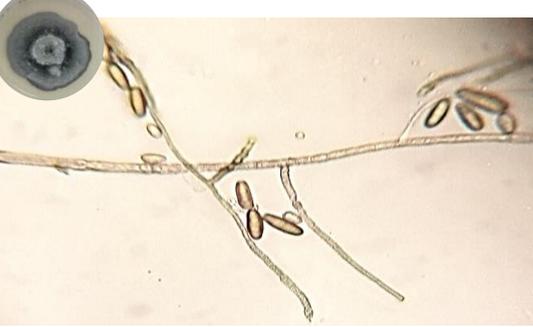
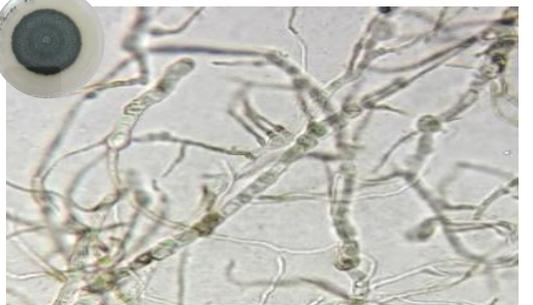
B3 17/2 (6)		<p><b>Recto</b> : gris.  <b>Verso</b> : noir.  <b>Croissance</b> : très rapide.  <b>Aspect</b> : duveteuse.  <b>Relief de la colonie</b> : plat.</p>	
B1 17/2 (1)		<p><b>Recto</b> : gris.  <b>Verso</b> : noire.  <b>Croissance</b> : rapide.  <b>Aspect</b> : poudreux.  <b>Relief de la colonie</b> : plat.</p>	
B2 20/2 (6)		<p><b>Recto</b> : gris à noir.  <b>Verso</b> : noire.  <b>Croissance</b> : très rapide.  <b>Aspect</b> : poudreux.  <b>Relief de la colonie</b> : plat.</p>	
B2 2j		<p><b>Recto</b> : centre jaune et bordure blanc.  <b>Verso</b> : marron foncé.  <b>Croissance</b> : très lente.  <b>Aspect</b> : duveteux.  <b>Relief de la colonie</b> : bombée avec des rides.</p>	
B2 17/2 (5)		<p><b>Recto</b> : vert sombre.  <b>Verso</b> : incolore.  <b>Croissance</b> : très rapide.  <b>Aspect</b> : poudreux.  <b>Relief de la colonie</b> : plissé.</p>	
B3 17/2 (7)		<p><b>Recto</b> : vert.  <b>Verso</b> : incolore.  <b>Croissance</b> : moyenne.  <b>Aspect</b> : cotonneux à poudreux.  <b>Relief de la colonie</b> : plissé.</p>	

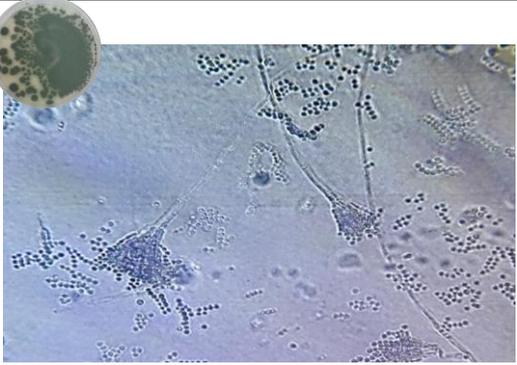
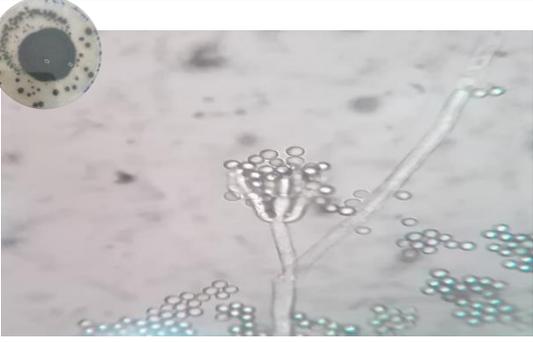
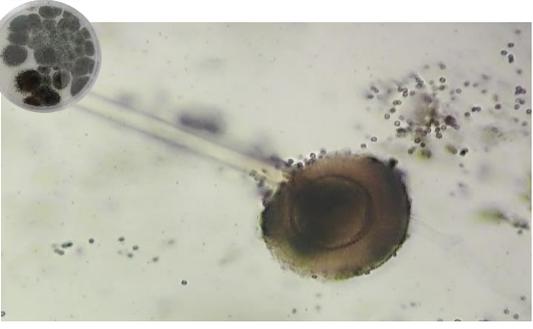
B2 11/2 (2)		<p><b>Recto :</b> noir.  <b>Verso :</b> incolore.  <b>Croissance :</b> très rapide.  <b>Aspect :</b> granuleuse.  <b>Relief de la colonie :</b> plissé.</p>	
B4 7/3		<p><b>Recto :</b> verte- olive.  <b>Verso :</b> noir.  <b>Croissance :</b> moyenne.  <b>Aspect :</b> veloutée.  <b>Relief de la colonie :</b> colonie avec centre bombée.</p>	

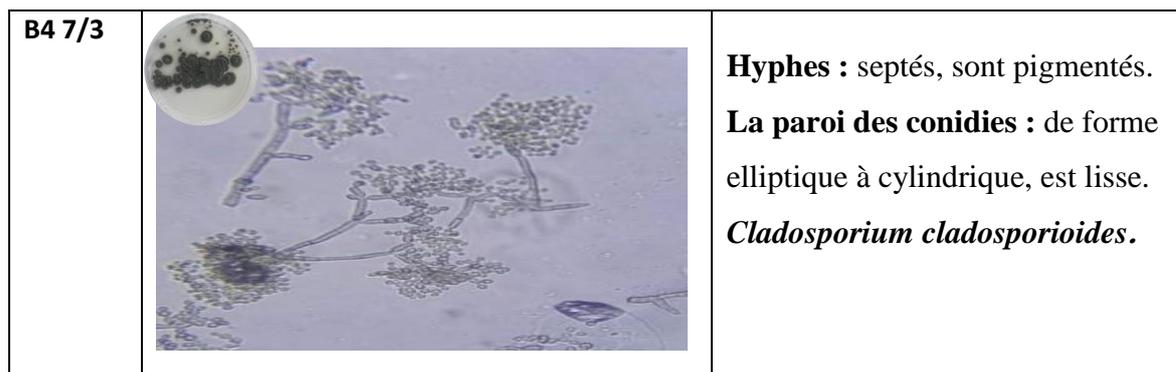
### Identification microscopique

**Tableau 4.** Caractérisation microscopique des isolats.

Codes	Photos microscopiques	Caractères microscopiques
B2 11/2 (4)		<p><b>Cellules conidiogènes :</b> cylindriques, groupées à l'extrémité de conidiophores.  <b>Conidiophores :</b> courts, septés et hyalins.  <i>Scopulariopsis sp.</i></p>
B2 17/2 (3')		<p><b>Non identifié</b></p>

<p><b>B6 17/2 (3*)</b></p>		<p><b>Conidiophore:</b> lisse, très long, incolore.</p> <p><b>Conidies:</b> lisses et très petites.</p> <p><b>Tête aspergillaire:</b> bisérié.</p> <p><i>Aspergillus sp1.</i></p>
<p><b>B3 17/2 (6)</b></p>		<p><b>hyphes :</b> septée devient rapidement brun foncée.</p> <p><b>Conidie :</b> oblongue en fuseau, cloisonnée seulement transversalement.</p> <p><i>bipolaris.</i></p>
<p><b>B1 17/2 (1)</b></p>		<p><b>Hyphes :</b> septés, brunes.</p> <p><b>Spores :</b> Il ya deux types de spores ; les une petites hyalines, les autres plus grandes ; arthroconidies</p> <p><i>Aureobasidium sp.</i></p>
<p><b>B2 20/2 (6)</b></p>		<p><b>Conidies:</b> brunes, lisses d'aspect ovoïde, produites en chaines, cloisonnées longitudinalement et transversalement.</p> <p><b>Conidiophores:</b> septés, lisses.</p> <p><i>Alternaria sp.</i></p>

B2 (2) j		<p><b>Conidiophore:</b> court, lisse, et incolore.</p> <p><b>Conidies:</b> globuleuse, petites.</p> <p><b>Tête aspergillaire:</b> unisérié.</p> <p><i>Aspergillus sp2.</i></p>
B2 17/2 (5)		<p><b>Hyphes:</b> septés.</p> <p><b>Conidiophores:</b> serrés les unes contre les autres, l'ensemble donne une image de pinceau.</p> <p><b>Conidies :</b> rondes, hyalines, lisses, disposé en chaines.</p> <p><i>Penicillium chrysogenum.</i></p>
B3 17/2 (7)		<p><b>Hyphes :</b> septés, hyalins, portent des conidiophores.</p> <p><b>Phialides :</b> à extrémité allongée sont regroupées en pinceau.</p> <p><b>Conidies :</b> sont rondes.</p> <p><i>Penicillium sp.</i></p>
B2 11/2 (2)		<p><b>Conidiophore:</b> lisse, hyalin.</p> <p><b>Conidies:</b> globuleuses, brunes, souvent disposées en chaines.</p> <p><b>Tête aspergillaire:</b> bisériée radiée, noire à maturité.</p> <p><i>Aspergillus niger.</i></p>



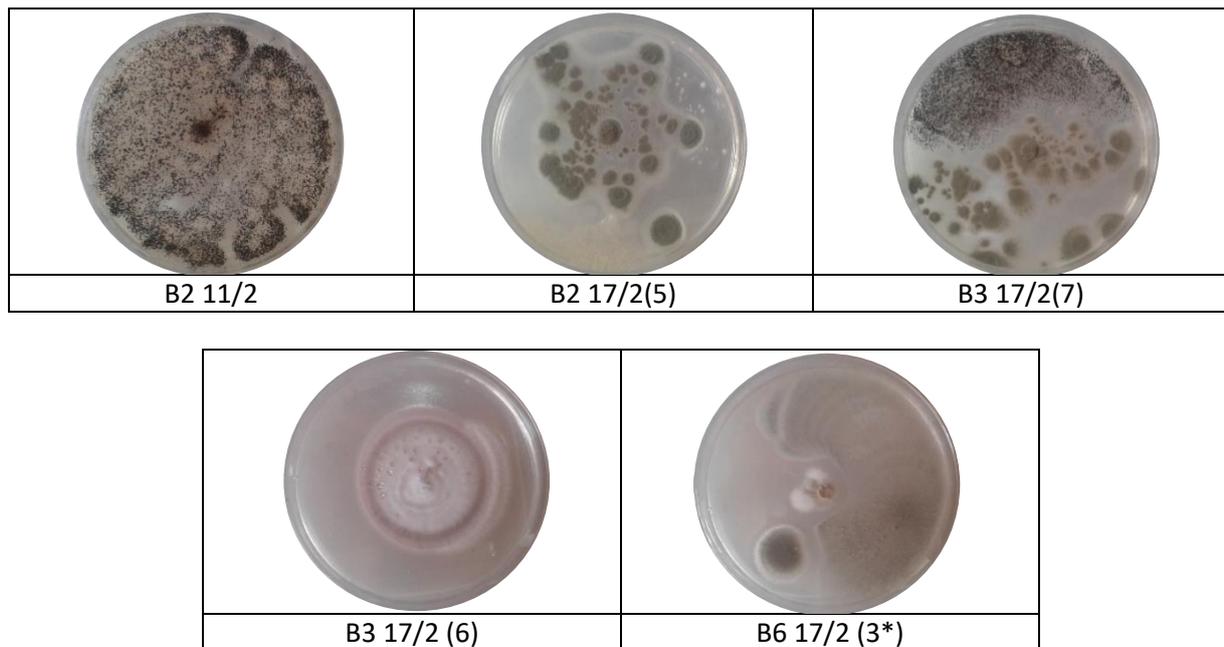
L'identification morphologique des isolats apparus a permis de les grouper selon leurs genres en : 3 groupes, donc la majorité sont des mycètes mélanisés appartenant aux genres *Cladosporium*, *Alternaria*, *bipolaris*. Le genre *Aspergillus* représente également un groupe dominant dans tous les échantillons suivi par le genre *Penicillium*. et Les formes moliniacés représentent le troisième groupe. Selon Dendouga *et al.*, 2015 les mycètes mélanisés se caractérisent par des spores et de mycélium sombre donc ils peuvent tolérer la déshydratation, et rayonnement mieux que les champignons moniliacés dont les cellules sont dépourvus de mélanine. La dominance du genre *Aspergillus* et *penicillium* expliqués par leur plus grande taux de production de spores et de dispersion.

#### 4.3.Caractérisation physiologique vis-à-vis de la salinité

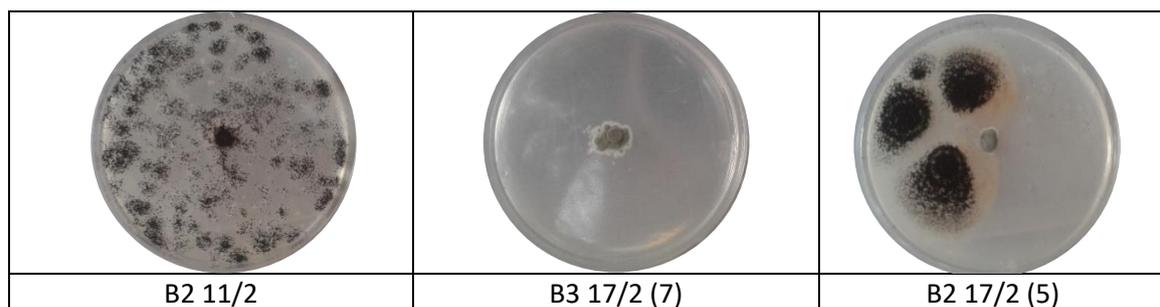
Le repiquage de nos isolats sur PDA aux différentes concentrations de NaCl a permis d'obtenir les résultats présentés dans le tableau 5 et la figure 4 et 5.

**Tableau 5.** La tolérance des isolats à la salinité.

Isolats	10% d'NaCl	17.5 % d'NaCl
<b>B2 11/2(4)</b>	-	-
<b>b6 17/2(3*)</b>	+	-
<b>b2 17/2(3')</b>	-	-
<b>b3 17/2(6)</b>	+	-
<b>B1 17/2(1)</b>	-	-
<b>b2 20/2</b>	-	-
<b>b2 2J</b>	-	-
<b>B2 17/2(5)</b>	+	-
<b>B3 17/2(7)</b>	+	+
<b>B2 11/2(2)</b>	+	+



**Figure 4.** Le test d'halotolérance des isolats à 10%.



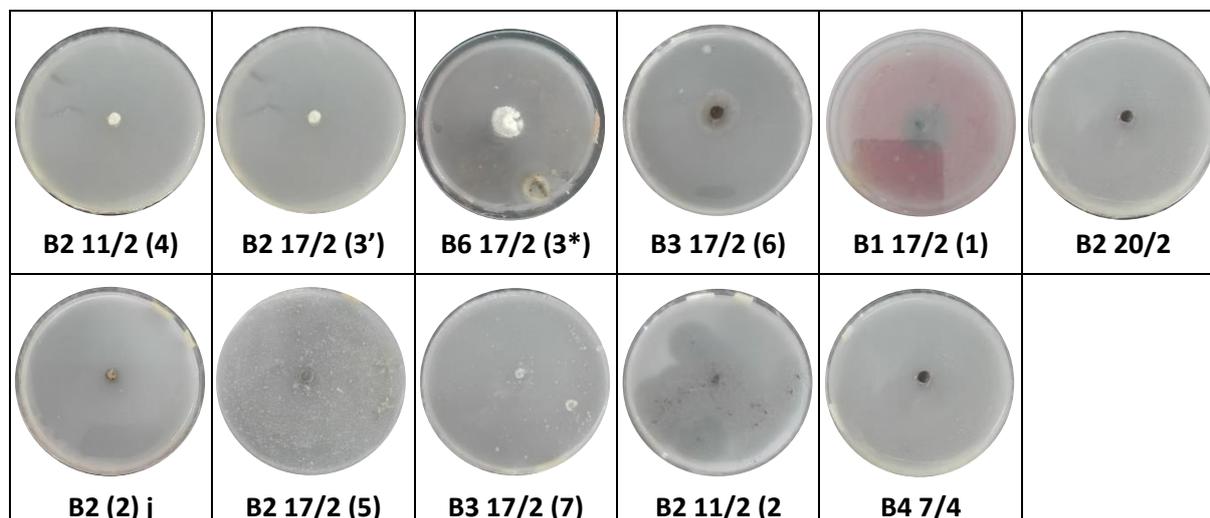
**Figure 5.** Test d'halotolérance des isolats à 17.5 %.

Les résultats résumés dans le tableau 5 et les figures 4 et 5 permettant d'observer la tolérance d'*Aspergillus niger* B2 11/2 (2), *Penicillium chrysogenum* B2 17/2(5), *Penicillium* sp. B3 17/2(7), *Bipolaris* sp. B3 17/2 (6) et *Aspergillus* sp. B6 17/2 (3\*) à une concentration de 10% d'NaCl. Cependant, *Aspergillus niger* B2 11/2 (2), *Penicillium* sp. B3 17/2(7) et *Penicillium chrysogenum* B2 17/2(5), peuvent tolérer même une concentration de 17.5 % de NaCl, ce résultat permet de classer ces trois derniers isolats comme halophiles alors que *Bipolaris* sp. B3 17/2 (6) et *Aspergillus* sp. B6 17/2 (3\*) sont halotolérants.

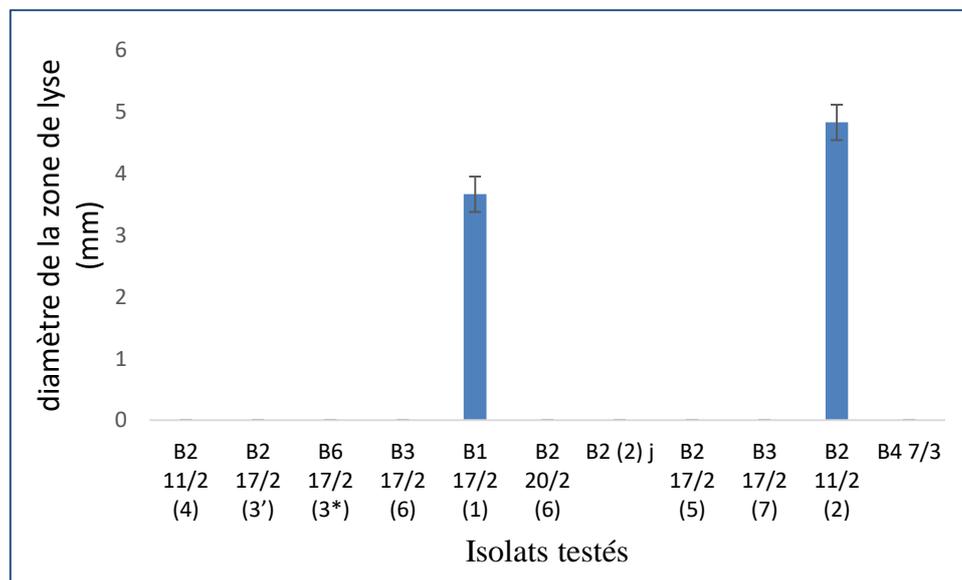
#### 4.5. Mise en évidence de l'activité hydrolytique

##### 4.5.1. Gélatinase

Les résultats obtenus après l'ensemencement de nos isolats sur gélose à base de gélatine ont permis la mise en évidence de l'activité protéolytique à l'égard de ce substrat, indiquée par des zones d'hydrolyses. Les résultats de ce test sont présentés dans les figures 6 et 7.



**Figure 6.** Mise en évidence de l'activité protéolytique sur gélose gélatinée.

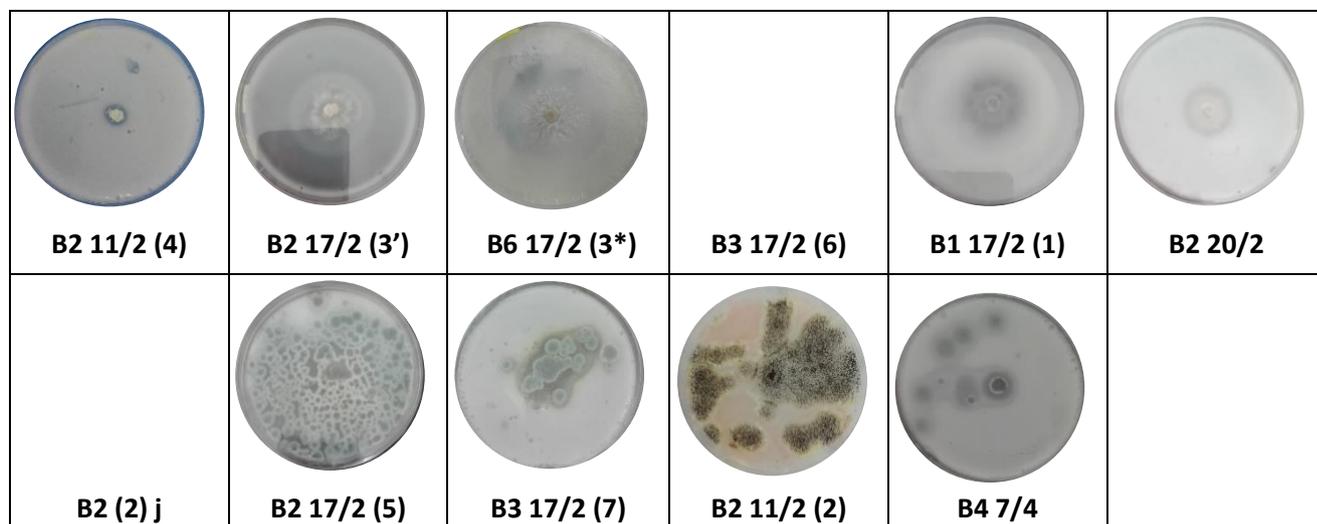


**Figure 5 .** Diamètre de la zone (mm) d'hydrolyse de caséine.

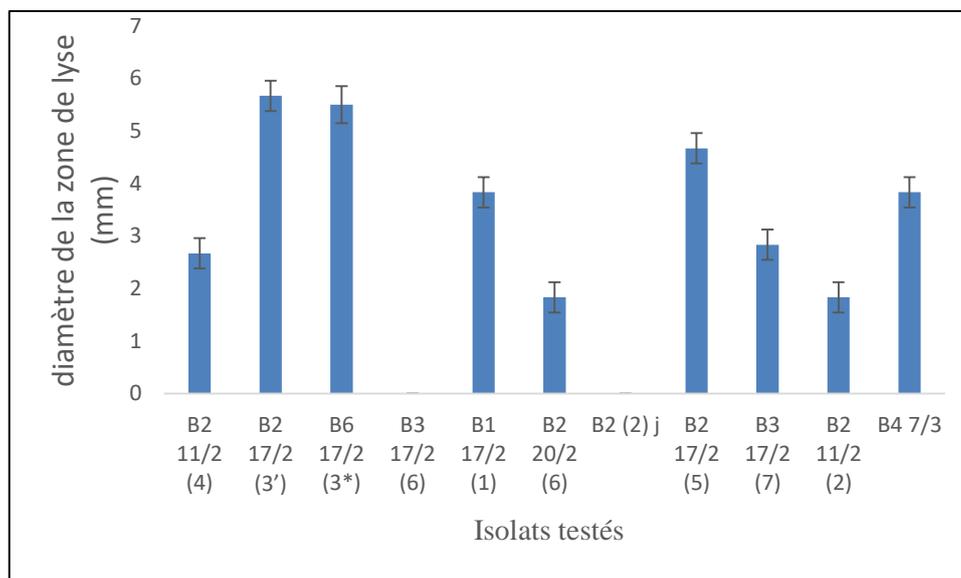
Ce test a démontré le caractère de sécrétion de gélatinase chez deux isolats de genre *Aspergillus niger* et *Aureobasidium* sp. Donc ces derniers utilisent la gélatine comme source de carbone.

#### 4.4.2. Caséinase

L'ensemencement de nos isolats sur milieu à base de lait gélosé a permis la mise en évidence de l'activité protéolytique chez 9 isolats, indiquée par des zones d'hydrolyses autour des colonies. Les résultats de ce test sont présentés dans les figures 8 et 9.



**Figure 8.** Mise en évidence de l'activité protéolytique sur lait gélosé à 30%.



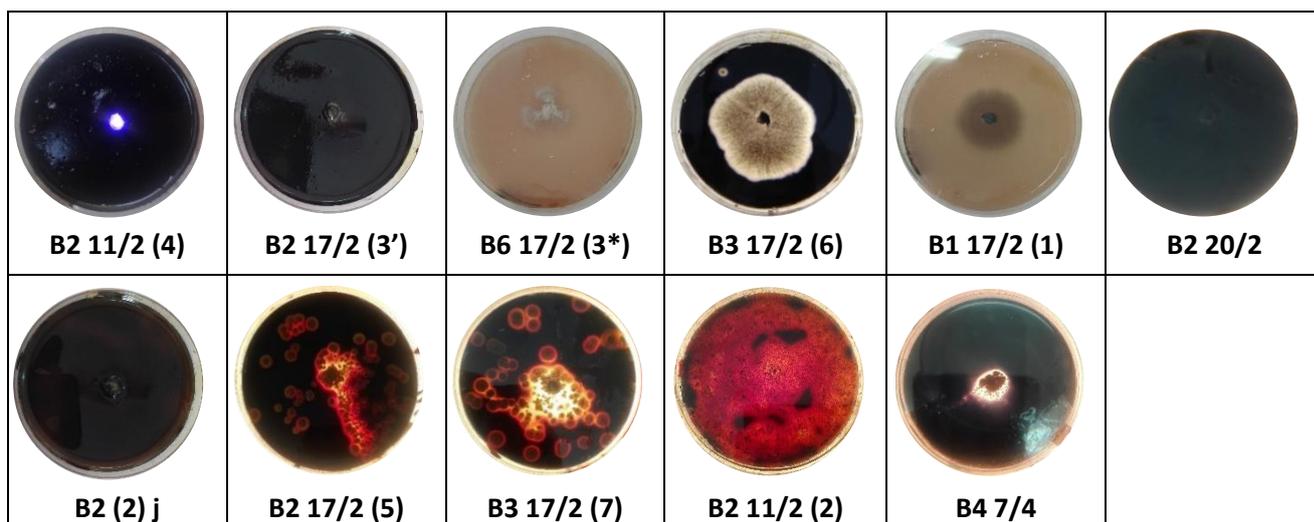
**Figure 9.** Diamètre de la zone (mm) d'hydrolyse de caséine.

Ces résultats permettent de considérer les isolats *Scopulariopsis* sp. B2 11/2 (4), B2 17/2 (3'), *aspergillus* sp1. B6 17/2 (3\*), *Aureobasidium* sp. B1 17/2 (1), *Alterneria* B2 20/2, *Peniciliuim chrysogenum* B2 17/2 (5), B3 17/2 (7) *Aspergillus niger* B2 11/2 (2), *cladosporuim cladosporioides* b4 7/4, comme producteurs de protéases exocellulaires, donc ils sont capables

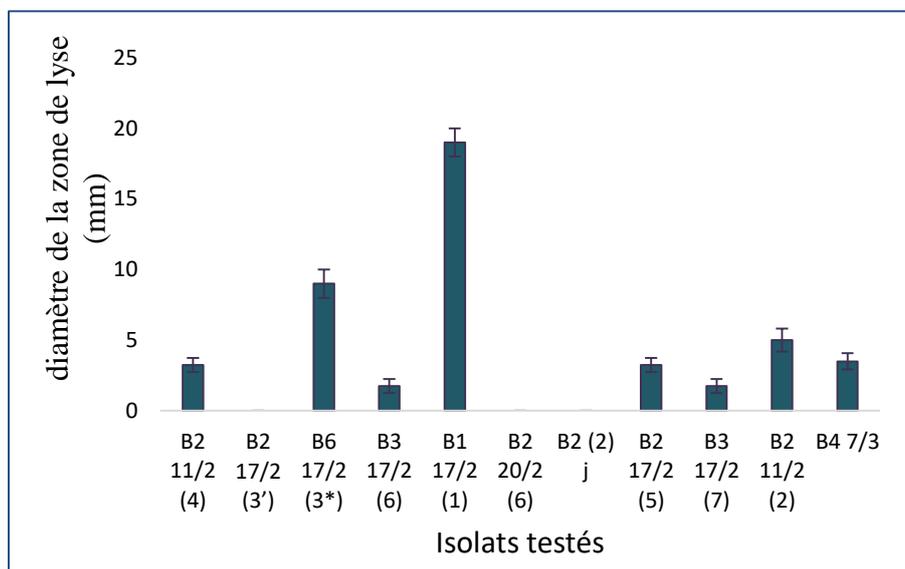
de dégrader la caséine du lait. Selon Ul-haq et *al.* (2003) les protéases peuvent être produites par plusieurs genres fongiques tels que l'*Aspergillus* et *Penicillium*.

#### 4.4.3. Amylase

Les résultats obtenus après l'ensemencement de nos isolats sur PDA à 1% d'amidon ont permis la mise en évidence de l'activité amylolytique, indiquée par des zones d'hydrolyses. Ces résultats sont présentés dans les figures 10 et 11.



**Figure 10.** Mise en évidence de l'activité amylolytique.

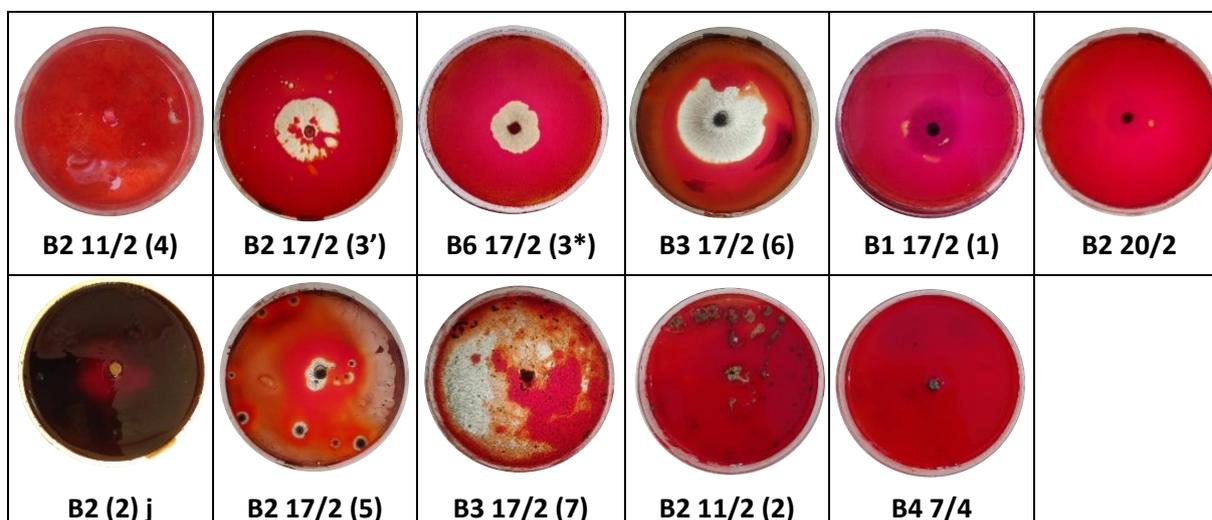


**Figure 11.** Diamètre de la zone (mm) d'hydrolyse de l'amidon.

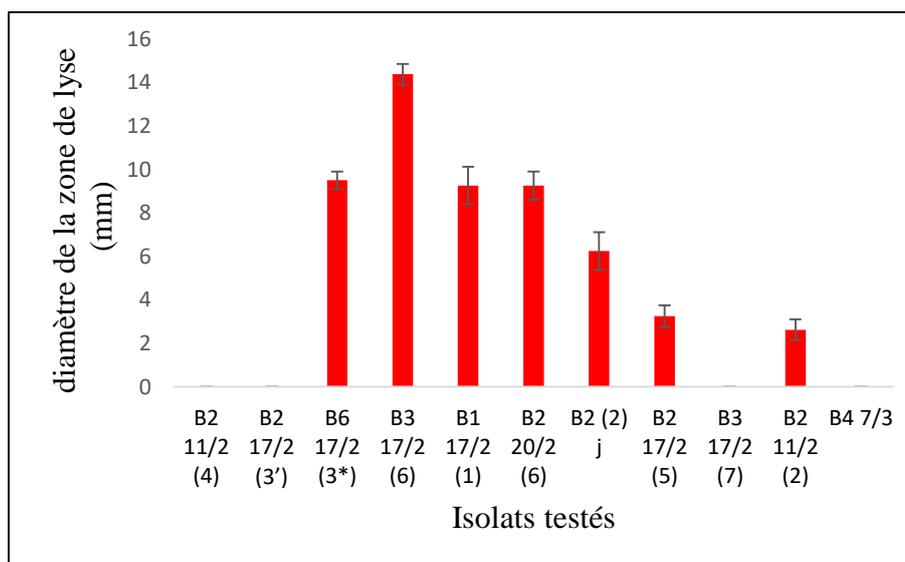
D'après les figures 10 et 11 on remarque que tous les isolats étudiés ont pu dégrader l'amidon, à l'exception d'*Aspergillus* sp2. B2 2j, *Alternaria* sp. b2 20/2(6).

#### 4.4.4. Cellulase

Les résultats obtenus après l'ensemencement de nos isolats sur CMC agar ont permis la mise en évidence de l'activité amylolytique, indiquée par des zones d'hydrolyses claires (figure 11 et 12).



**Figure 12.** Mise en évidence de l'activité cellulolytique.

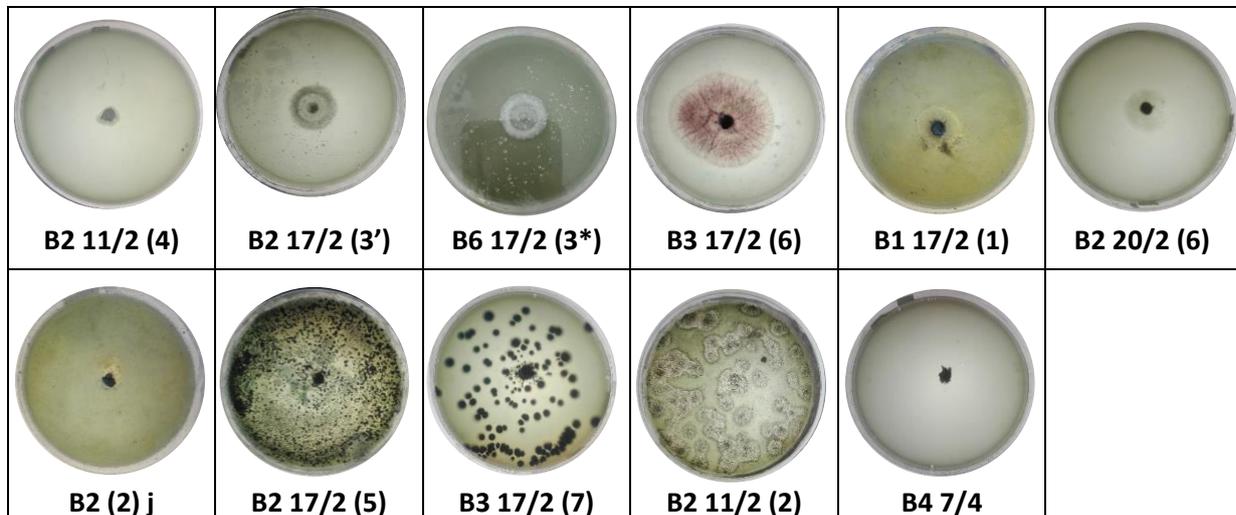


**Figure 13.** Diamètre de la zone (mm) d'hydrolyse de cellulose.

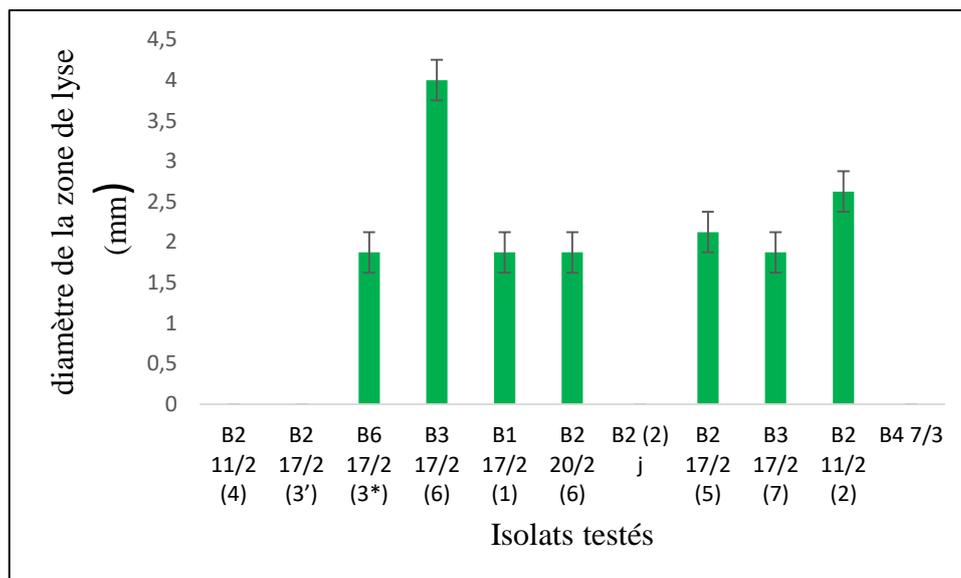
Les isolats *Aspergillus* sp1. B6 17/2 (3\*), *Bipolaris* b3 17/2(6), *Aureobasidium* sp.B1 17/2, *Alternaria* B2 20/2, (1), *Aspergillus* sp 2.B2 2j, *Penicilium chrysogenum* B2 17/2 (5), *Penicillium* sp. B3 17/2 (7) ont présenté un test positif à l'égard de cellulose, donc ils sont producteurs de cellulase exocellulaires capables de dégrader les fibres de cellulose en l'utilisant comme source de carbone et d'énergie. Selon Kanti, (2015) les cellulase sont obtenus principalement à partir d'*Aspergillus* et *Penicillium*.

#### 4.4.5. Pectinase

Les résultats obtenus après l'ensemencement de nos isolats sur un milieu gélosé à base de pectine sont résumés dans les figures 12 et 14.



**Figure 14.** Mise en évidence de l'activité pectinolytique.

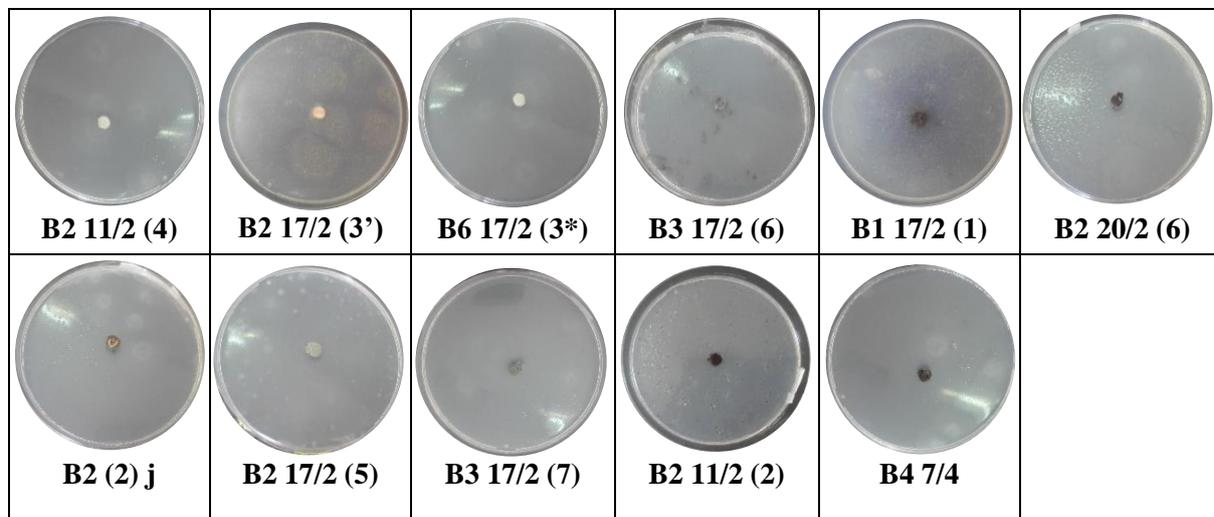


**Figure 15.** Diamètre de la zone (mm) d'hydrolyse de pectine.

Les résultats obtenus montrent que sept isolats qui sont *Aspergillus* sp1. *Bipolaris* b3 17/2(6), *Aureobasidium* sp.B1 17/2 *Alternaria* sp.b2 20/2(6), *Penicilium chrysogenum* b2 17/2 (5), *Penicillium* sp. b2 17/2(7), *Aspergillus niger*, ont une activité pectinolytique, donc ils sont capables d'utiliser la pectine comme substrats pour leur croissance.

#### 4.4.6. Lipase

L'ensemencement de nos isolats sur milieu à base d'huile d'olive a donné les résultats montrés dans la figure 16.



**Figure 16.** Mise en évidence de l'activité lipolytique.

L'analyse

des résultats présentés dans la figure 16 permet de révéler l'hydrolyse de lipase uniquement chez deux isolats qui sont : *Aspergillus niger* b2 11/2 (2) et *penicillium Penicilium chrysogenum* b2 17/2 (5). Gween, (2005) a rapporté qu'une variation existe entre les différentes souches d'*Aspergillus niger* par rapport à leur production de lipases extracellulaire.

# **Conclusion**

## Conclusion

Ce travail a été mené dans le but d'isoler des champignons filamenteux avec des caractéristiques d'intérêt industriel, ainsi que d'étudier leur profil hydrolytique.

L'étude physicochimique a montré que le sol de Chott Tiguidine représente un milieu extrême par rapport aux paramètres suivants ; la salinité élevée, l'alcalinité du sol et la teneur faible en matière organique. Ces conditions présentent l'avantage d'isoler des extrémophiles qui vivent très souvent dans des milieux présentant plusieurs conditions physicochimiques extrêmes.

L'étude microbiologique a montré le peuplement faible en biomasse fongique dans Chott Tiguidine et également la faible diversité, justifiée par les conditions environnementales défavorables dans ce site.

La production d'enzymes extracellulaires examinée par des tests qualitatifs, nous a permis de confirmer la conclusion que les champignons filamenteux sont des microorganismes capables de s'adapter dans diverses conditions environnementales par leur capacité de sécrétion des enzymes hydrolytiques extracellulaires.

En perspective, nos travaux sont une étape préliminaire pour des études plus larges, plus approfondies et plus accomplies incluant :

- l'identification des champignons qui se fera à l'échelle moléculaire.
- La quantification de la production enzymatique de ces champignons.
- L'optimisation de la production de ces enzymes.

# **Références bibliographiques**

## Références bibliographiques

Aires-Barros M. R., Taipa M. A. & Cabral J. M. 1994. Isolation and purification of lipases. In 'Lipase, their structure, biochemistry and application'. Eds. P. Woolley and S. B. Petersen. Cambridge University Press, pp 271-288.

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

Ait Kaki A., Leghlimi H., Dakhmouche S., Bennamoun L., Meraihi Z. 2012. Utilisation de la planification expérimentale pour l'optimisation de la production de l' $\alpha$ -amylase par *Rhizopus oryzae*. Rev. Microbiol. Ind. San. Environn 6(1): 1–17.

Ait kaki A. 2017. L' $\alpha$ -Amylase d'une nouvelle souche de *Rhizopus oryzae* FSIS4 isolée de blé des zones arides : Production, Purification, Caractérisation, Etude des propriétés et Essai de panification. Thèse de doctorat d'état, Université Frères Mentouri, Constantine 1, 142p.

Amoozegar M. A. 2007, Karbalaei-Heidari H. R., Ziaee A. A., Purification and biochemical characterization of a protease secreted by the *Salinivibrio* sp. strain AF-2004 and its behavior in organic solvents. Extremophiles, 11(2) :237-243.

Amoozegar M. A., Malekzadeh, F., Malik, K. A. 2003. Production of amylase by newly isolated moderate halophile, *Halobacillus* sp. strain MA-2. *Journal of microbiological methods* 52(3) : 353-359.

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

Ayad R. 2011. Screening d'activités hydrolytiques extracellulaires chez des microorganismes halophiles aérobies isolés d'environnements hypersalins de l'Est algérien. Thèse de magister, Université Mentouri, Constantine, 90 pages.

Benkahoul M., Talhi A., Boulefkhad N. 2017. Bactéries des environnements chauds Algériens: isolement et mise en évidence de la production d'hydrolases. *Sciences & Technologie. C, Biotechnologies* (45) : 25-35.

Bhat M. K. 2000. Cellulases and related enzymes in biotechnology. *Biotechnology advances*, 18(5), 355-383.

Bonnefoy C., Guillet F., Leyral G., Verne E. et Bourdais. 2002. Microbiologie et qualité dans les industries agroalimentaires. Doin, France, p150.

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,p12-426.

Botton B., Breton A., Fevre M., Gauthier S., Guy P.H., Larpent J.P., Reymond P., Sanglier J.J., Vayssier Y., Veau P. 1990. Moisissures utiles et nuisibles importance industrielle. 2<sup>ème</sup> édition. Masson. Collection Biotechnologies, p : 34-428.

Boumaraf B., Bensaid R., et Marre A. 2014. Paysages et sols dans la vallee d'oued righ, sahara nord oriental, Algérie. courrier du savoir, (18) :103-110.

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.

Boutalba S. 1997. Contribution à l'étude de la flore fongique du lac d'El Goléa: taxonomie, écologie et production de métabolites. Thèse de magistère, universite Abou-bekr Belkaid, Tlemcen, 76 pages.

Calvet R., (2000). Le sol : Propriétés et fonction. France agricole, Paris, 90 p.

Castegnaro M., and Pfohl-Leszkowicz A. 2002. Les mycotoxines: contaminants omniprésents dans l'alimentation animale et humaine. *La sécurité alimentaire du consommateur* (2) :127-79

Chabasse D. 2002. Les moisissures d'intérêt médical. Cahier n°25 de formation de biologie médicale, 25-27 p.

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

Davet P. et Rouxel F. 1997. Détection et isolation des champignons du sol. *INRA* , Paris, p 17-54.

Dedet J P. 2007. La microbiologie, de ses origines aux maladies émergentes. Dunod, Paris, p.168.

Delarras C. 2007. Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyse ou de contrôle. Lavoisier, Paris, p. 320.

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 (Algérie), Constantine, 120 pages.

- 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.
- Denis B. 1988. Guide des analyses courantes en pédologie. INRA, Paris, p 20.
- Diguta C. F. 2010. Ecologie des moisissures présentes sur les baies de raisin. Thèse de doctorat d'état, université de Bourgogne, 154 p.
- Fickers P., Destain J., Thonart P. 2007. Les lipases sont des hydrolases atypiques : principales caractéristiques et applications. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ* **12**(2) : 119-130.
- Figarella J., Leyral A. et Terret M. 2007. Microbiologie technique (Dictionnaire des techniques. Centre régional de documentation pédagogique d'Aquitaine, Bordeaux, p 24-25.
- 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  $\alpha$ -amylase and structural explanation of observed specificities. *Eu. J. Biochem* (267): 2166-2173.
- Gansen P. V. et Alexandre H. 2004. Biologie générale. Dunod, Paris, p 227.
- Gao J., Weng H., Zhou D., Yuan M., Guan F., Xi Y. 2008. Production and characterization of cellulolytic enzymes from the thermoacidophilic fungal *Aspergillus terreus* M11 under solide state cultivation of corn stover. *Bioressour Technol* (99): 7623-7629.
- Grantina, L., Seile, E., Kenigvalde, K., Kasparinskis, R., Tabors, G. et al., (2011). The influence of the land use on abundance and diversity of soil fungi: comparison of conventional and molecular methods of analysis. *Environmental and Experimental Biology*, 9, 9-21.
- Guiraud J. 1998. Microbiologie Alimentaire. p.652
- Guiraud J. P. 2003. Microbiologie alimentaires. Dunod, Paris, 333 p.
- Hasper A A., Dekkers E., Mil M V., Van de Vondervoort P J I., De Graaff L H. 2002. Egl C, a new endoglucanase from *Aspergillus niger* with major activity towards xyloglucan. *Appl. Environ. Microbiol*, 68 (4): 1556-1560.
- Horikoshi 1999. Alkaliphiles: Some applications of their products for biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* (63) p. 735-750.
- kanti A., 2015 Carboxymethyl Cellulose Hydrolyzing Yeast Isolated from South East Sulawesi, Indonesia Khamir Penghidrolisa Selulosa Karboxymethyl yang Diisolasi dari Sulawesi Tenggara Indonesia *11*(2) :285-294.

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* 11(1) : 17-25.

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.

Kumar S, Grewal J, Sadaf A, Hemamalini R and, Khare SK. 2016. Halophiles as a source of polyextremophilic  $\alpha$ -amylase for industrial applications. *AIMS Microbiol* 2:1–26.

Leghlimi H. 2013. Cellulase de souches fongiques issue du sol d'un milieu extrême (sol proche de sources thermales). Sélection des souches et étude des caractéristiques des enzymes. Thèse de doctorat d'état, universite constantine 1.134 p.

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.

Leyral G. et Vierling E. 2007. Microbiologie et toxicologie des aliments (Hygiène et sécurité alimentaires). Doin éditeurs. Centre régional de documentation pédagogique d'Aquitaine, France, 281p.

Madigan T. M. et Martinko M. J. 2007. Brock biologie des micro-organismes. Pearson. France. 1047 p.

Marilley L., VOGT, G., Aragno M. 2007. Diversité bactérienne du sol et de la rhizosphère et effet d'une augmentation en CO<sub>2</sub> atmosphérique Soil and rhizosphere bacterial diversity and effect of the atmospheric CO<sub>2</sub> content, Symposium, ( 479) :1-7

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* ( 5) : 135-144.

Mathieu, C., Pieltain, F., & Jeanroy, E. 2003. Analyse chimique des sols: Méthodes choisies. Tec & doc.

Morozkina E. V., Slutskaya E. S., Fedorova T. V., Tugay T. I., Golubeva L. I., Koroleva O. V. 2010. Extremophilic microorganisms : Biochemical adaptation and biotechnological application. *Applied Biochemistry and Microbiology* (46) :1-14.

Mouria B, Ouazzani-Touhami A, Douira A. 2012. Isolement Et Identification De La Mycoflore Du Compost Des Déchets Urbains Solides, Nature & Technologie, P13-P28.

NASRAOUI B. 2006. Les champignons parasites des plantes cultivées. Biologie, systématique, pathologie, maladie. Centre de publication universitaire. Tunisie.

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

Peciulyte D. 2007. Isolation of cellulolytic fungi from waste paper gradual recycling materials. *Ekologija*, 53: 11–18.

Perry J. J., Staley J. T. & Lory, S. 2004. Microbiologie. Dunod, Paris, p.228.

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

Prescott L. M., Harley J. P. et Klein D. A. 2003. Microbiologie. DE Boeck et Larcier SA. Bruxelles. 1088 p.

Quérellou J., et Guézennec, J. 2010. Biotechnologie des extrêmophiles. *Techniques de l'Ingenieur*, 1-13.

Raven P. H., Evert R. F. et Eichhorn S. E. 2003. Biologie végétale. De Boeck, Paris. P. 312.

Reddy L.V.A., Wee Y.-J., Yun J.-S., Ryu H.-W. 2008. Optimization of alkaline protease production by batch culture of *Bacillus* sp. RKY3 through Plackett–Burman and response surface methodological approaches. *Bioresour. Technol*, **99** : 2242–2249.

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

Rohwerder T. and Sand W. 2007. Oxidation of inorganic sulfur compounds in acidophilic prokaryotes. *Engineering in Life Sciences*, 7 : 301-309.

Salar R. K. and Aneja K. R. 2007. Thermophilic Fungi: Taxonomy and Biogeography. *Journal of Agricultural Technology*, 3 : 77-107

Semal, 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. Pp178, 181,185, 186,194.

Sharma, N., Rathore, M., & Sharma, M. (2013). Microbial pectinase: sources, characterization and applications. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 12(1) : 45-60.

Smeltzer M. S., Hart M. E. & Iandolo J. J. 1992. Quantitative spectrometric assay for staphylococcal lipase. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58 : 2815-2819.

Souza P.M. 2010. Application of microbial  $\alpha$ -amylase in industry – a review. *Brazilian Journal of Microbiology*. (41) : 850-861.

Tatiana daCosta RP, and Flevo F. 2005. Extraction and assay of pectic enzymes from Peruvian carrot (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft). *Food Chem.* 89, P : 85-92.

Tortora G. J., Funk B. R. et Case C. L. 2007. *Microbiology air Introduction*. Edition du Renouveau Pédagogique Inc. Saint-Laurent. 945 p.

Tortora J., Funk B.F. and Case Ch. 2003. *Introduction à la microbiologie*, (edn) ISBN. Canada.

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

Ul-Haq I., Mukhtar H., Daudi S., Sikander A. & Quadeer M. A. 2003. Production of proteases by a locally isolated mould culture under lab. conditions. *Biotechnology* 2 (1) : 30- 36.

Verger R., Rivière C., Moreau C., Gargouri Y., Rogalska E., Nury S., Moulin A., Ferrato F., Ransac S., Carrière F., Cudrey C. & Tretout N. 1990. Enzyme kinetics of lipolysis. In "Lipases : Structure, Mechanism and Genetic Engineering", Alberghina et al. (eds.). Bridge, Germany, pp : 105-116.

Vierling E., 2008. *Aliments et boissons: technologies et aspects réglementaires*. Doin, France, 80 p.

Wang X., XU X., WU M., and Yang Y. 2002. Induction and regulation of cellulase formation in two strains of fungi by different carbon sources. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 8(6), 653-657.

Wang Y., Zhou J., Chu J., Luo L., Ying-Ping Z., Si-Liang Z. 2009 Optimization of cellulase mixture for efficient hydrolysis of steam-exploded corn stover by statistically designed experiments.

Zeni J., Pili, J., Cence K., Toniazzo, G., Treichel, H., and Valduga E. Characterization of novel thermostable polygalacturonases from *Penicillium brasilianum* and *Aspergillus niger*. *Bioprocess and biosystems engineering*, (2015) ; 38(12), 2497-2502.

**Site web**

**(01)** : [www.Catre d'Algérie/chott tiguédidine.com](http://www.Catre d'Algérie/chott tiguédidine.com)

**(02)** : <https://nl.weather-forecast.com/locations/Djamaa/forecasts/latest>.

# **Annexes**

## 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).

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

**Préparation du lactophénol.**

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

**Annexe 03. Activité enzymatique.****Milieu gélose gélatinée**

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

**Milieu à base de lait gélosé à 30 %.**

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

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

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

pH = 5 ; Stérilisation à 110°C pendant 30 minutes.

### Milieu CMC-agar

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

pH=5 ; Stérilisation à 120°C pendant 20 minutes.

### Milieu Pectine-agar

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

pH =5 ; 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	100 ml.

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	1 g.
Iodure de potassium	2 g.
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	100 ml.

**Chlorure de sodium de 1 M**

Chlorure de sodium	5.8 g
Eau distillée	100ml.

### ملخص

بصد عزل فطريات خيطية تملك مميزات ذات اهمية في المجال الصناعي واختبار إنتاجها للهيدرولاز . تم أخذ عينات من تربة شوت تيغديدين واجراء تحليلات فيزيائية كيميائية لها, وقد اظهرت هذه الاخيرة درجة حموضة قلوية للغاية، موصلية كهربائية عالية، مع مستوى المادة العضوية أقل من 1٪، وغنية نسبيا بشوارد الكلور. حيث تبين هذه التحليلات أن منطقة دراستنا تمثل نظام إيكولوجي متطرف في حين التحليلات الميكولوجية مكنتنا من الحصول على 11 عزلة تم اختبار نشاطها الهيدرولوجي معدل وجود 81.81% من النشاط التحلل البروتيني 72.72% من نشاط التحلل النشواني , 63.63% من النشاط البكتينوليتيكي والسيليلوزي في حين 18.18% فقط من نشاط التحلل الدهني.

**الكلمات المفتاحية :** فطريات خيطية ,وسط متطرف,هيدرولاز,شط تيغديدين,تربة.

### Résumé

Dans le cadre d'isoler des champignons filamenteux extrémophiles avec des caractéristiques d'intérêt industriel et de tester leur production en hydrolases, des prélèvements ont été effectués à partir du sol de Chott Tighdidine. Les analyses physicochimiques du sol ont montré que le sol de Chott Tighdidine est à pH alcalin, une conductivité électrique élevée, un taux en matière organique très faible (inférieur à 1%) et une richesse en ion de chlorure, ce qui représente un écosystème extrême. L'isolement sur PDA a permis d'obtenir 11 isolats de champignon filamenteux halotolérants. Le test qualitatif de l'activité hydrolytique extracellulaire a montré que 81.81 % des isolats sont protéolytiques, 72.72% sont amylolytiques, 63.63% sont cellulolytique, 63.63% sont pectinolytique alors que seulement 18.18% sont lipolytiques.

**Mots clés :** champignons filamenteux, milieux extrêmes, hydrolases, Chott Tigudidine, sol.

### Abstract

As part of isolating extrémophiles filamentous fungi with characteristics of industrial interest and testing their production in hydrolases. Samples were taken from Chott Tigudidine. Chemical physico analyses of the soil have shown that our soil samples have a highly alkaline pH, a high electrical conductivity, with an organic matter level of less than 1%, and relatively rich in chloride ion. These analyses show that our study area represents an extrem ecosystem. Isolation on PDA resulted in 11 filamentous fungi isolates. While the qualitative test of hydrolytic activity showed a presence rate of 81.81 % of proteolytic activity, 72.72% of amylolytic activity and 63.63% of cellulolytic activity, 63.63% of pectinolytic activity and 18.18 of lipolytic.

**Key words :** filamontous fungi, extrem environnement, hydrolas, Chott Tegudidine, soil.