



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 : Biochimie appliquée

Réf. : .....

---

Présenté et soutenu par :  
**Khaoula BOUSSAHA**

Le :10 Octobre 2020

### **Thème**

### **Caractérisation phénotypique des moisissures isolées d'un milieu extrême (Hammame El-Baraka, El-Hadjeb)**

---

#### **Jury :**

Mme. Imane MERZOUGUI	MCB	Université de Biskra	Président
Mme. Wassila DENDOUGA	MCB	Université de Biskra	Rapporteur
M. Abdelhamid MOUSSI	Pr	Université de Biskra	Examineur

Année universitaire : 2019/2020

## Remerciements

*« Al hamdo li Allah » profondément pensé et ressenti, Al Hamdo li Allah pour l'infinité de belles choses qu'il m'a accordé et pour avoir illuminé mon chemin et soutenu mes pas.*

*En second lieu, on remercie chaleureusement notre encadreur Mme. DENDOUGA Wassila, de nous avoir données la possibilité de réaliser ce travail sous sa suivie et pour le temps qu'elle nous a consacré, sa patience, ses précieux conseils, son soutien tout le long de la réalisation de notre mémoire ainsi que pour sa gentillesse, sa bienveillance et ses qualités profondément humaines qui ont été remarquables.*

*Mes sincères remerciements vont aussi aux membres de jury pour l'honneur qu'ils auront fait en acceptant de juger ce travail*

*MERZOUQUI Imane en tant que président du jury.*

*MOUSSI Abdelhamid en tant qu'examineur.*

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

*Finalement, Nous adressons notre reconnaissance à tous nos proches pour le support moral, l'encouragement et la compréhension qu'ils nous ont offerts tout au long de nos études.*

## *Dédicace*

*Je dédie ce travail :*

*A mes chères mères Rachida et Naima*

*Aucun mot, aucune dédicace ne saurait exprimer à sa juste valeur, l'ampleur de l'affection et de l'admiration que j'éprouve pour vous.*

*Mon diplôme vous appartient. Que Dieu vous garde et vous accorde longue vie afin que je puisse à mon tour vous combler. Je vous aime.*

*Mon très cher père Farid*

*Pour être le bon exemple de père par son soutien, ses encouragements et aides dès mes premiers pas d'études jusqu'à ce jour.*

*A mes charmantes sœurs Zineb, Chiraze et le petite Dhikra ;*

*Lumière de mes jours vous êtes tout pour moi.*

*A mes très chers frères Brahim, Zouhier, Abd Errahmane, Fares*

*Puisse dieu vous procurer santé, bonheur et réussite.*

*A mes très chères grands mère Ourida et Khadidja*

*Que dieu vous accorde longue vie et bonne santé.*

*A mes oncles, tantes surtout khalti Fatima et Mima*

*Que dieu vous accorde longue vie et bonne santé.*

*A ma chère khalti Kheira*

*Que ton âme repose en paix.*

*A mon très cher fiancé Zaki*

*Depuis que je t'ai connu, tu n'as cessé de me soutenir et de m'épauler. Je te remercie pour ta patience et tes encouragements. Je remercie le Dieu de t'avoir mis sur mon chemin.*

*A toute la famille BOUSSAHA et TELLOUL.*

*Khaoula.*

# Table des matières

Remerciements	
Dédicace	
Liste des tableaux .....	I
Liste des figures .....	II
Liste des abréviations .....	III
Introduction .....	1

## **Première partie : Synthèse bibliographique**

### **Chapitre 1 : Les champignons extrêmophiles**

1. Champignons filamenteux .....	3
1.1. Généralité .....	3
1.2. Caractéristiques morphologiques générales .....	3
1.3. Classification .....	4
1.3.1. Chytridiomycètes .....	4
1.3.2. Zygomycètes .....	4
1.3.3. Ascomycètes .....	4
1.3.4. Basidiomycètes .....	4
1.3.5. Deutéromycètes .....	4
1.4. Mode de reproduction .....	5
1.5. Reproduction asexuée .....	5
1.6. Reproduction sexuée .....	5
1.7. Conditions de croissance .....	6
1.7.1. Eléments nutritifs .....	6
1.7.2. Facteurs physicochimiques .....	6
1.8. Mode de vie des champignons .....	6
1.8.1. Saprophytisme .....	6
1.8.2. Parasitisme .....	6
1.8.3. Symbiose .....	6
1.9. Champignons extrêmophiles .....	7
1.9.1. Champignons thermophiles .....	7
1.9.2. Champignons halophiles .....	7

1.9.3. Champignons acidophiles et alcalophiles .....	7
2. Milieux extrêmes .....	7
2.1. Généralités .....	7
2.2. Environnements à hautes températures.....	8
2.3. Environnements hypersalins .....	8
2.4. Environnements à pH acide et à pH alcalin .....	8

## **Chapitre 2 : Les enzymes extrêmophile**

1. Généralité.....	9
2. Hydrolases .....	9
2.1. $\alpha$ -amylases .....	9
2.2. Protéases .....	10
2.3. Cellulases .....	10
2.4. Lipases .....	11
2.5. Pectinases.....	11

## **Deuxième partie : Partie expérimentale**

### **Chapitre 3 : Matériel et méthodes**

1. Présentation de la région d'étude.....	12
2. Echantillonnage .....	12
3. Analyses physico-chimiques du sol.....	14
3.1. Mesure du pH.....	14
3.2. Mesure de la conductivité électrique (CE).....	14
3.3. Détermination du taux d'humidité .....	14
4. Isolement des champignons à partir du sol.....	14
4.1. Préparation du milieu de culture.....	14
4.2. Préparation des suspensions-dilutions .....	14
4.3. Ensemencement .....	15
4.4. Purification.....	15
4.5. Identification des souches isolées .....	15
4.5.1. Identification macroscopique .....	15
4.5.2. Identification microscopique.....	16
4.6. Caractérisation physiologique vis-à-vis la salinité .....	16

### **Chapitre 4 : Résultats et discussion**

1. Analyses physico-chimiques du sol.....	17
---	----

1.1. pH.....	17
1.2. Conductivité électrique .....	17
1.3. Humidité .....	18
2. Isolement .....	18
3. Identification morphologique .....	19
3.1. Identification macroscopique.....	19
3.2. Identification microscopique .....	21
4. Caractérisation physiologique vis-à-vis de la salinité .....	21
5. Caractérisation physiologique vis-à-vis de la température.....	22
6. Mise en évidence de l'activité hydrolytique.....	23
6.1. Activité amylolytique.....	23
6.2. Activité cellulitique.....	23
6.3. Activité pectinolytique.....	24
6.4. Activité lipolytique .....	25
6.5. Activité protéolytique .....	25
Conclusion.....	27
Bibliographie.....	28
Annexes	
Résumés	

# Liste des tableaux

<b>Tableau 1.</b> Analyses physico-chimiques des échantillons du sol.....	17
<b>Tableau 2.</b> Classification du sol selon le pH (Denis, 2000).....	17
<b>Tableau 3.</b> La salinité de sol en fonction de leur conductivité électrique (Gueye, 2013).....	17
<b>Tableau 4.</b> Observations quotidiennes de l'ensemencement des différentes dilutions du sol sur PDA pendant 10 jours. ....	18
<b>Tableau 5.</b> Aspect macroscopique des champignons filamenteux isolés du sol de Hammam El-Baraka (El-Hadjeb, Biskra). ....	19
<b>Tableau 6.</b> Aspects microscopiques des champignons filamenteux isolés. ....	21
<b>Tableau 7.</b> La tolérance des isolats à la salinité. ....	21

## Liste des figures

<b>Figure 1.</b> Schématisation de la reproduction asexuée et sexuée d'une moisissure (Lecellier, 2013).....	5
<b>Figure 2.</b> Situation géographique de la région d'étude (wilaya de Biskra). .....	12
<b>Figure 3.</b> Photos original du site de prélèvement de Hammam El-Baraka (El-Hadjeb, Biskra). .....	13
<b>Figure 4.</b> Différentes étapes d'échantillonnage.....	13



# Liste des abréviations

**pH** : potentiel d'Hydrogène.

**°C** : degré Celsius.

**CE** : Conductivité Electrique.

**PDA**: Potato Dextrose Agar.

**NaCl** : chlorure de sodium.

**SAM** : milieu de gélose à l'amidon.

**CMC** : Carboxy-Méthyl-Cellulose.

**IE** : Index Enzymatique.

**YPSS** : gélose à l'amidon soluble dans la levure.

$\frac{R}{r}$  : Rayon du halo lipolytique / rayon de la colonie.

**MEA** : l'extrait de malt.

---

# Introduction

---

# Introduction

Le sol est l'habitat naturel pour des myriades de microorganismes et d'autres formes vivantes, formant des populations de différents genres. Le nombre et l'activité de ces populations changent d'une région à une autre, influencés par le contenu de matières organiques du sol, la texture du sol, le pH, l'humidité, la température, l'aération et d'autres facteurs (Ruark et Zarnoch, 1992 ; Madigan *et al.*, 1997 ; Subler et Kirsch, 1998 ; Peuk, 2000 ; Smith *et al.*, 2000). L'évaluation de la biomasse microbienne, a montré que dans la plupart des sols, les mycètes sont le composant principal (Bååth et Söderström, 1980 ; Schnürer *et al.*, 1985).

Les moisissures, ou les mycètes ou encore les champignons filamenteux, sont des acteurs importants du monde microbien. Ils sont impliqués dans une multitude de processus biologiques de l'environnement. Ils présentent, en outre, un intérêt économique, en raison à la fois de leur utilité et de leurs activités néfastes multiples: altérations des produits alimentaires et détériorations dans de nombreux autres domaines : production de mycotoxines, vie parasitaire aux dépens de l'homme, des animaux et des plantes (Mehravar et Sardari, 2011; Pereira *et al.*, 2013).

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). Par ailleurs, les moisissures synthétisent un grand nombre de substances complexes économiquement très importantes : acides organiques, alcaloïdes, antibiotiques, terpènes et enzymes (Mehravar et Sardari, 2011; Pereira *et al.*, 2013).

Les micro-organismes extrémophiles produisent des enzymes, qui sont des catalyseurs biologiques, fonctionnelles dans des conditions extrêmes. Ces enzymes qui sont nommées extrémozymes peuvent être valorisables, car elles présentent des applications particulières lors de processus industriels, comme la transformation de produits chimiques, alimentaires ou pharmaceutiques (Niehaus *et al.*, 1999; Van den Burg, 2003).

Dans ce contexte, la présente étude est effectuée, dont l'objectif principal est d'isoler des champignons filamenteux extrémophiles ; choisissant comme milieux extrême, le sol de

hammame El-Braraka (commune d'El-Hadjeb-Biskra) Pour atteindre notre objectif, notre travail est organisé en cinq étapes ;

1. Echantillonnage à partir du sol de Hammam El-Baraka d'El-hadjeb (Biskra), le choix de ce site est pour augmenter la probabilité d'isoler des champignons filamenteux extrêmophiles.
2. Analyses physicochimiques des échantillons du sol ;
3. Isolement des champignons filamenteux ;
4. Caractérisation phénotypique (morphologique et physiologique) des isolats obtenus ;
5. **Tester la production des isolats extrêmophiles en enzymes hydrolytiques (partie non réalisée -covid19-), cette partie est remplacée par une synthèse et discussion entre les différents travaux du même domaine.**

---

**Première partie**  
**Synthèse bibliographique**

---

---

# **Chapitre 1**

## **Les champignons extrêmophiles**

---

## 1. Champignons filamenteux

### 1.1. Généralité

Les champignons filamenteux ou les moisissures peuvent être définies comme des microorganismes hétérotrophes filamenteux et immobiles, dont la structure cellulaire est celle d'une cellule eucaryote classique (Nicklin *et al.*, 2000).

Les champignons appartiennent des organismes thallophytes (Semal *et al.*, 1993). Leur appareil végétatif constitué par un thalle filamenteux, le mycélium, dont les filaments s'appellent des hyphes. Le mycélium peut différencier des organes forts variés selon les groupes, spécialisés dans la multiplication et la dissémination, auxquels on accorde la dénomination globale de spores (Bourgeois, 1989).

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. Caractéristiques morphologiques générales

- **Paroi:** Les moisissures présentent des parois cellulaires, qui sont différentes de celles des plantes, elles sont composées de chitine et non de cellulose (Indge, 2004).

- **Noyaux :** Ils sont minuscules, et dépourvus de chlorophylle et de pigments assimilateurs (Genevès, 1990 ; Genevès, 1992).

- **Mitochondries :** existent dans le cytoplasme, circulaire, ovale ou allongées. Souvent assez petites, dont les crêtes sont en général moins nombreuses et moins développées que chez les cormophytes ou les animaux.

- **Membrane plasmique :** (ou plasmalemm) similaire à celle des autres eucaryotes, consistant en une bicouche de phospholipides et des protéines et stérols associés (Nasraoui, 2015).

- **Thalle :** Le corps ou le 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, possédant un cytoplasme commun (Ait Abdelouahab, 2001).

### 1.3. Classification

La classification des moisissures, tout comme celle des autres champignons, est d'abord basée sur le mode de reproduction sexuée (phase téléomorphe). Ce critère définit quatre des cinq ordres des mycètes, soit les Chytridiomycètes, les Zygomycètes, les Basidiomycètes et les Ascomycètes. En outre, lorsque la reproduction sexuée n'est pas connue, la division est appelée Deuteromycotina ou champignons imparfaits (Blackwell *et al.*, 1998).

#### 1.3.1. Chytridiomycètes

Ce sont les types de champignons les plus primitifs. Il est aqueux, au mycélium large peu ou pas cloisonné, dont les spores sont fournies avec un flagelle.

#### 1.3.2. Zygomycètes

Sont des champignons microscopiques à mycélium siphonné, de diamètre irrégulier, pourvu de nombreux noyaux non séparés par des cloisons. Essentiellement saprophytes, ils se présentent sous forme de moisissures (Bouchet *et al.*, 1999). Ils produisent des spores sans flagelles. La reproduction sexuée aboutit à la formation de zygospores d'où le nom Zygomycètes (Chabasse, 2008).

#### 1.3.3. Ascomycètes

Ces champignons présentent une structure caractéristique appelée asque qui est un sporocyste particulier formé au cours de la reproduction sexuée. L'asque renferme le plus souvent un nombre défini de spores ou ascospores formées après fusion de deux noyaux suivie de la méiose. Il peut être globuleux, cylindrique ou plus ou moins claviforme (Benmessaoud, 2010).

#### 1.3.4. Basidiomycètes

Ils sont caractérisés par la production de spores sexuées, appelées basidiospores, formées par bourgeonnement à l'apex de cellules allongées, les basides. Les Basidiomycètes ont un thalle cloisonné avec présence de « boucles » au niveau des cloisons (Chabasse *et al.*, 2002). Beaucoup d'entre eux sont des parasites de végétaux, d'autres de redoutables opportunistes chez l'homme.

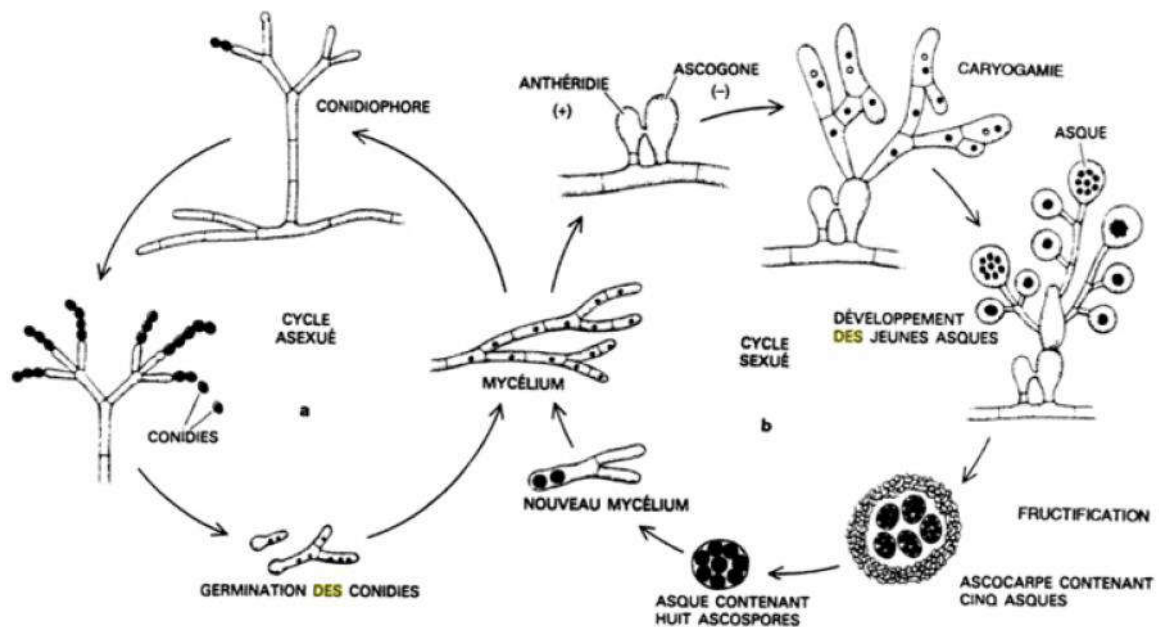
#### 1.3.5. Deutéromycètes

Egalement appelés champignons imparfaits, les Deutéromycètes sont caractérisés par un mycélium cloisonné et une reproduction végétative réalisée par des spores asexuées ou par simple fragmentation du mycélium (Boiron, 1996).



### 1.4. Mode de reproduction

Ils se reproduisent grâce à des spores, qui sont issues soit d'une reproduction sexuée (champignon téléomorphe) ou d'une multiplication asexuée (champignon anamorphe). Certains champignons, chez lesquels, les deux formes coexistent sont appelés holomorphes.



**Figure 1.** Schématisation de la reproduction asexuée et sexuée d'une moisissure (Lecellier, 2013).

### 1.5. 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).

### 1.6. Reproduction sexuée

La reproduction sexuée est assurée par des gamètes ou des spores formées à la suite d'une méiose. 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).

## **1.7. Conditions de croissance**

### **1.7.1. Eléments nutritifs**

Les moisissures sont des microorganismes hétérotrophes, elles exigent donc la présence des éléments nutritifs de base (carbone, azote et ions minéraux) dans le milieu qui assure leur croissance (Davet, 1996). Pratiquement tous les composés organiques peuvent être utilisés comme source de carbone et d'énergie par les moisissures (Boiron, 1996 ; Nicklin *et al.*, 2000), 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 au moins différentes selon l'espèce (Uchikoba *et al.*, 2001).

### **1.7.2. 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 moisissures ont en général un besoin en eau faible par rapport aux autres microorganismes (Davet, 1996), et un pH dans une zone de 4.5 à 8.0 (Botton *et al.*, 1999).

## **1.8. Mode de vie des champignons**

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

### **1.8.1. Saprophytisme**

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

### **1.8.2. Parasitisme**

Plusieurs champignons mènent une vie parasite vis-à-vis des substances organiques (Florent, 1993). Le parasitisme est généralement nuisible et souvent nocif. C'est le cas des espèces responsables de maladies sur les végétaux tel que l'oïdium (blanc) (Bouchet *et al.*, 1999).

### **1.8.3. Symbiose**

Définie comme une association étroite et durable entre les organismes d'espèces différentes, pouvant appartenir à des règnes différents vivant en équilibre les uns avec les autres, mais pouvant vivre séparément (Raven *et al.*, 2000 ; Marouf et Reynaud, 2007).

## **1.9. Champignons extrémophiles**

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

### **1.9.1. Champignons thermophiles**

Les thermophiles sont des microorganismes qui se développent à des températures relativement élevées, entre 45°C et 80°C (Madigan et Martino, 2006).

### **1.9.2. Champignons halophiles**

Les halophiles représentent un groupe de microorganismes qui vivent dans les environnements hypersalins et exigent dans beaucoup de cas la salinité pour survivre (DasSarma, 2001).

### **1.9.3. Champignons acidophiles et alcalophiles**

Les alcalophiles sont des microorganismes qui se développent de façon optimale à pH supérieur à 9 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 croitre à un pH de 10.5 (Martins *et al.*, 2001). Par contre, les acidophiles sont des microorganismes qui se développent de façon optimale à un pH de 2.0 (Morozkina *et al.*, 2010).

## **2. Milieux extrêmes**

### **2.1. Généralités**

Les formes de vie sur terre sont innombrables, comme les environnements qui les abritent. Jusqu'au 20<sup>ème</sup> 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 découvrir des organismes qui survivent dans des conditions hors de ces normes, dans des milieux caractérisés par des conditions physiques et/ou chimiques extrêmes (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 a ces condition extrêmes mais celles-ci sont requises pour leur croissance et développement (pikuta et hoover, 2007).

Comme tous ces environnements il ya le sol qui est un milieu fragile et très longtemps considéré comme un simple support de l'agriculture (Calvet, 2000). Le sol est l'habitat d'une

variété d'organismes, y compris les bactéries, les champignons, les protozoaires, les insectes, les nématodes, les vers, et de nombreux autres animaux (Prescott *et al.*, 1995).

Il en existe différents groupes de milieux extrêmes. Tous sont répartis en fonction des paramètres physiques (pression, température...), ou chimiques (acidité, salinité ...). La température, le pH et la salinité interagissent très fortement dans un biotope extrême (Kristjansson et Hreggvidsson, 1995).

### **2.2. 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, c'est entre 45°C et 80°C (Madigan et Martino, 2006).

### **2.3. Environnements hypersalins**

Les milieux hypersalins sont ceux dont la teneur en sels dissouts est supérieure à celle de l'eau de mer (35g/l) (Satyanarayana *et al.*, 2005).

### **2.4. 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. Cependant, un environnement alcalin est caractérisé par un pH de 10 ou plus (Morozkina *et al.*, 2010).

---

# **Chapitre 2**

## **Les enzymes extrêmophile**

---

## 1. Généralité

Les enzymes sont des macromolécules de haute masse moléculaire (10 à 100KDa) présentes dans les cellules de tous les organismes vivants. Ces catalyseurs biologiques jouent un rôle essentiel en contrôlant les procédés métaboliques permettant aux nutriments d'être transformés en énergie et en matériaux cellulaires (Drouin, 2005), 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 microorganismes extrêmophiles 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).

Les enzymes peuvent être classées selon leur mode d'action spécifique. En industrie, la classe d'enzyme la plus exploitée est celle des hydrolases (Hebbeche, 2014).

Les enzymes sont divisées en plusieurs classes selon leur mode d'action spécifique. Au niveau industriel, la classe d'enzyme la plus exploitée est celle des hydrolases.

## 2. Hydrolases

Les hydrolases sont des enzymes de dégradation. Elles provoquent la coupure d'une molécule et fixent les radicaux H et OH de l'eau sur les valences libérées. Ces enzymes ne nécessitent pas généralement de coenzymes, elles sont activables par des cations (Bornscheuer, 2002). Il est très difficile de classer les hydrolases. Le plus simple est d'étudier leur action sur quelques groupes de molécules. Généralement, les hydrolases produites par les champignons sont des enzymes endocellulaires (catalase, lactase et invertase) ou exocellulaires (amylases, cellulases, pectinases et protéases) (Meziani et Mahcene, 2017). Ces dernières sont libérées dans le milieu extérieur ou localisées sur la surface de champignons, ce qui simplifie leur récupération (Nabors, 2008).

Dans la nature, les microorganismes utilisent les enzymes pour dissocier les protéines, les polysaccharides, les lipides et d'autres grandes molécules, les réduisant en monomères, servant de source de carbone et d'énergie (Nabors, 2008).

### 2.1. $\alpha$ -amylases

L' $\alpha$ -amylase est une endoenzyme qui hydrolyse au hasard, les liaisons osidiques de l'amylose, de l'amylopectine, de l'amidon, du glycogène et d'autres polysaccharides contenant plus de trois liaisons  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 4) D-Glucose (Franco et *al.*, 2000). Elle provoque la libération du glucose, du maltose et surtout d' $\alpha$ -dextrines (Souza, 2010).

Actuellement, les  $\alpha$ -amylases microbiennes sont parmi les enzymes les plus utilisées dans les procédés industriels: industrie alimentaire, pharmaceutique, textile, papeterie, et détergent, en raison de leur productivité et thermostabilité. Avec l'arrivée de nouvelles frontières en biotechnologie, le spectre d'application de l' $\alpha$ -amylase s'est élargi vers d'autres domaines, comme la chimie clinique, médicale et analytique (Pandey *et al.*, 2000).

### 2.2. 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 protéases constituent les enzymes les plus importantes qui peuvent être produites par plusieurs genres fongiques. Ce groupe d'enzymes dispose de possibilités d'applications biotechnologiques très étendues. Actuellement elles sont de plus en plus utilisées en boulangerie, dans l'industrie alimentaire humaine et animale, dans les détergents pour lessives, dans l'industrie des tanneries et l'industrie pharmaceutique (Frazier, 1967 ; Ul-haq *et al.*, 2003).

### 2.3. Cellulases

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

La biotechnologie des cellulases a débuté vers les années 1980 dans l'alimentation animale (Chesson, 1987), et ensuite dans l'industrie du textile, de la lessive et du papier. Les cellulases représentent environ 20% du marché mondial des enzymes (Bhat, 2000, Lekchiri *et al.*, 2006). Les performances élevées atteintes leurs ouvrent des perspectives intéressantes pour différentes applications industrielles (Scriban, 1993), dans les industries de transformation de l'amidon, de brasserie, l'extraction de jus de fruits et légumes (Gao *et al.*, 2008). L'une des applications potentielles des cellulases est la production d'éthanol-carburant à partir de la biomasse lignocellulosique (Leghlimi, 2013).

#### 2.4. Lipases

Les lipases appartiennent à la famille des hydrolases d'esters carboxyliques. Le rôle physiologique des lipases est d'hydrolyser les triglycérides en diglycérides, monoglycérides, acides gras et glycérol (Mats *et al.*, 1994).

Les lipases utilisées dans les détergents, les dégraissants, dans l'industrie de l'alimentation et de textile, dans les pâtes et papier, dans les secteurs pharmaceutique et cosmétique, etc. (Gandhi, 1997; Jaeger et Reetz, 1998; Sharma *et al.*, 2011). 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 elle s'interviennent dans la maturation des fromages (Hasan *et al.*, 2006).

#### 2.5. Pectinases

Les enzymes pectinolytiques ou pectinases représentent un groupe hétérogène d'enzymes qui hydrolysent les substances pectiques et qui sont largement distribuées dans les plantes supérieures et dans les micro-organismes (Jayani *et al.*, 2005).

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).



---

**Deuxième partie**  
**Partie expérimentale**

---

---

# **Chapitre 3**

## **Matériel et méthodes**

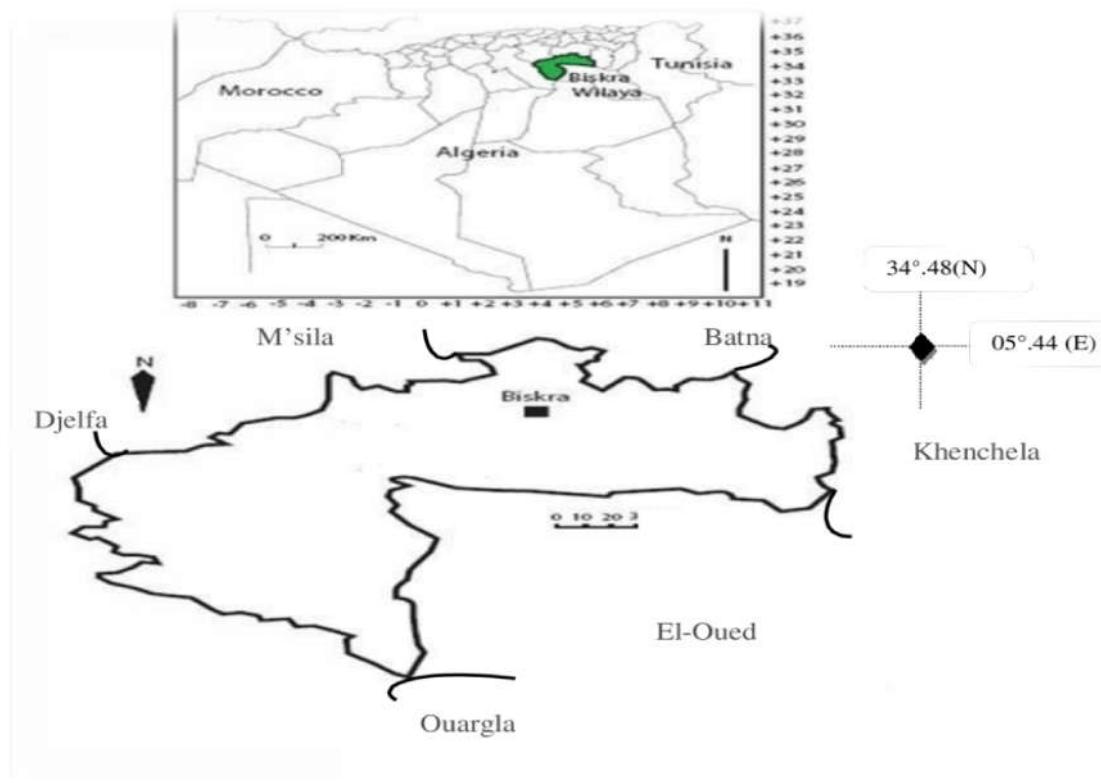
---

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

La wilaya de Biskra se situe au Sud Est de l'Algérie, elle occupe une superficie de 21671 km<sup>2</sup>, son altitude est de 128 mètres au niveau de la mer. Elle est caractérisée par un climat froid en hiver, chaud et sec en été.

La wilaya de Biskra (Figure 2) est limitée par :

- Le Nord : Wilaya de Batna et M'sila.
- Le Sud : Wilaya d'Ouargla. Et El-Oued.
- L'Est : Wilaya de Khenchela.
- L'Ouest : Wilaya de Djelfa (Bouchemal et Achour, 2015).



**Figure 2.** Situation géographique de la région d'étude (wilaya de Biskra).

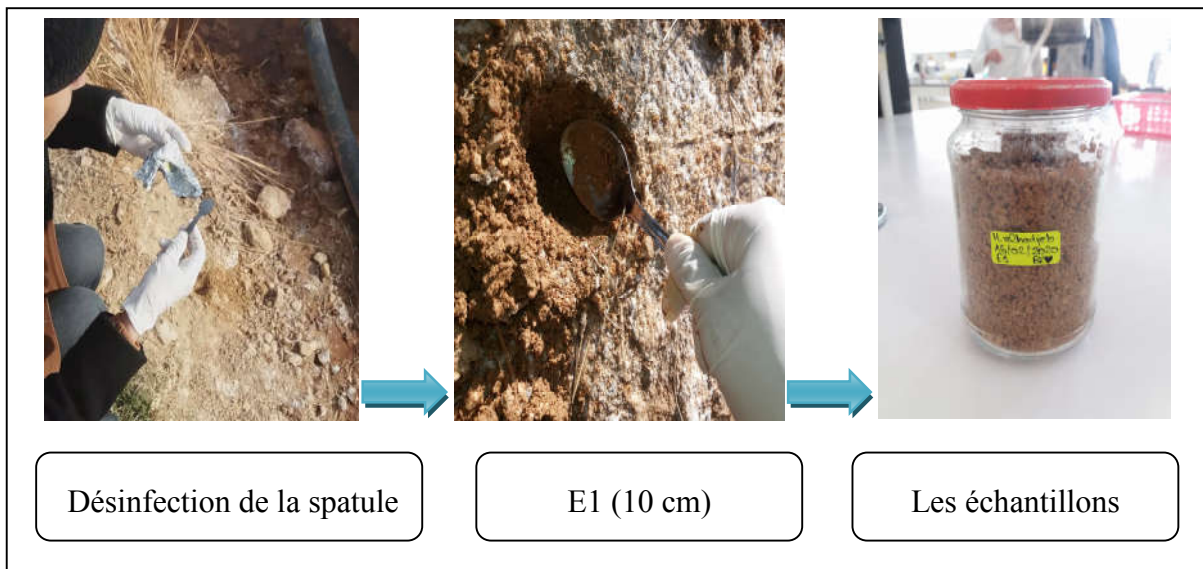
### 2. Echantillonnage

Le site de prélèvement de nos échantillons du sol est situé à 12 Km, à l'ouest de la ville de Biskra, c'est Hammam El-Baraka, commune d'El-Hadjeb (Figure 3).



**Figure 3.** Photos original du site de prélèvement de Hammam El-Baraka (El-Hadjeb, Biskra).

Les 03 échantillons du sol ont été pris le 16/02/2020 à une profondeur de 10 cm, dont les 5 premier 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. L'ensemble des échantillons collectés pour les analyses microbiologiques et physicochimiques est transporté au laboratoire, où ils ont été conservés 4°C.



**Figure 4.** Différentes étapes d'échantillonnage.

### 3. Analyses physico-chimiques du sol

#### 3.1. Mesure du pH

Pour la mesure de pH du sol de nos échantillons, on a commencé par la préparation d'une suspension du sol (la concentration de 0.2 g/ml). Une agitation pendant 45 min est réalisée pour l'obtention d'une suspension homogène, puis le pH de sol pour chaque échantillon a été déterminé à l'aide d'un pH mètre (Aubert, 1978).

#### 3.2. Mesure de la conductivité électrique (CE)

La mesure de la conductivité électrique de nos échantillons du sol nécessite la préparation d'un homogénat du sol (la concentration de 0.2 g/ml). Puis une agitation rigoureuse pendant 1h à l'aide d'un agitateur magnétique permet l'obtention d'un homogénat du sol. La suspension est laissée pendant 30 min à une température ambiante ensuite la conductivité électrique est mesurée 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:

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

**H %** : pourcentage d'humidité.

**PH** : poids humide.

**PS** : poids sec.

### 4. Isolement des champignons à partir du sol

#### 4.1. Préparation du milieu de culture

Le milieu utilisé le long de notre travail est le PDA (Potato Dextrose Agar, Annexe 01). Il s'agit d'un milieu nutritif général qui permet le développement de tous les champignons.

La croissance bactérienne est inhibée par l'addition de gentamycine aux milieux de culture avant leur stérilisation à une concentration de 5 mg/l (Botton *et al.*, 1999). Le milieu est autoclavé à 121°C pendant 20 minutes avant leur utilisation.

#### 4.2. Préparation des suspensions-dilutions

On a respecté l'ensemble des règles d'asepsie le long de notre travail de manière à éviter toute contamination. Une quantité de 1g de sol est mis en suspension dans 9 ml d'eau physiologique stérile (NaCl 9 g/L), puis le mélange est agité au vortex pendant 10 min. Cette suspension est considérée comme la solution mère.

Une série de dilutions est préparée dans des tubes de 9 ml d'eau physiologique stérile. A partir de chaque suspension du sol, une série de dilution décimale est effectuée jusqu'à  $10^{-3}$  (Bonnefoy *et al.*, 2002).

Après la préparation des dilutions, une agitation vigoureuse avec le vortex a permis l'homogénéisation des milieux. A chaque échantillon, il a été attribué un code désignant son origine et son degré de dilution. La préparation des dilutions a pour objectif d'aider à obtenir, dans la mesure du possible, des isolats séparés.

#### **4.3. Ensemencement**

Le travail d'ensemencement a été pratiqué autour d'un bec bunsen. Un volume de 1 ml de chaque dilution est déposé dans une boîte de Pétri contenant 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 25-30°C et sont observées quotidiennement pendant 15 jours, où on a noté l'apparition de chaque colonie fongique.

#### **4.4. Purification**

Avant d'entamer l'identification, on procède à la purification des isolats à l'aide d'une série de repiquage, donc chaque colonie de moisissure apparue a été repiquée au centre et individuellement dans une autre boîte de Pétri jusqu'à l'obtention des souches pures (Botton *et al.*, 1990). 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.

#### **4.5. Identification des souches isolées**

La purification et l'identification restent les opérations les plus difficiles dans le domaine de la mycologie. L'identification 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.

##### **4.5.1. Identification macroscopique**

Cet examen permet de déterminer les quatre caractères culturels suivants : la vitesse de croissance, la texture et la couleur du thalle, la couleur du revers de la culture et son odeur (Harrigan et McCance, 1976 ; Rinaldi *et al.*, 1998 ; Botton *et al.*, 1999).

#### **4.5.2. 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 examiner à l'aide d'une pince, puis déposé sur une lame (Chabasse *et al.*, 2002), en lui ajoutant comme diluant le lactophénol-bleu coton (Annexe 02) (Dendouga, 2006). Généralement, un examen à l'objectif X40 est suffisant pour mettre en évidence la plupart des éléments importants (Cahagnier et Richard-Molard, 1998).

Ce type d'identification est fondé essentiellement sur l'étude morphologique de mycélium (absence ou présence de cloisons, couleur, différenciation,...) et des spores (forme, couleur, texture des parois,...) (Guiraud, 1998).

#### **4.6. 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 du NaCl, à des concentrations progressives: 5, 10, 15%. Chaque isolat est ensemencé par un repiquage au centre et incubé à 30°C pendant 7 jours (Guiraud, 2003).

---

# **Chapitre 4**

## **Résultats et discussion**

---



## 1. Analyses physico-chimiques du sol

Les analyses physicochimiques des différents échantillons du sol collectés du Hammam El-Baraka ont permis d'obtenir les résultats présentés dans le tableau 1.

**Tableau 1.** Analyses physico-chimiques des échantillons du sol

Echantillons	pH	CE (ms/cm)	Humidité (%)
E1	8.53	0.51	10
E2	8.30	0.77	20
E3	8.27	0.71	10

### 1.1. pH

Selon Denis (2000), on a pu classer le sol de nos échantillons, dont le pH est compris entre 8.27 et 8.53 comme un sol alcalin. Ce résultat est similaire aux études de Rouahna (2007). La classification du sol selon le pH est présentée dans le tableau 2.

**Tableau 2.** Classification du sol selon le pH (Denis, 2000).

Valeur du pH	Qualification du sol
Inférieur à 3.5	Hyper acide
Entre 3.5 et 4.2	Très acide
Entre 4.2 et 6.5	Acide
Entre 6.5 et 7.5	Neutre
Entre 7.5 et 8.7	Basique
Supérieur à 8.7	Très basique

### 1.2. Conductivité électrique

Généralement, on estime la salinité d'un sol par les mesures de la conductivité électrique de l'extrait aqueux ou d'une pâte saturée en eau distillée (Dekhinat et al, 2010). En se basant sur les résultats de nos mesures de la conductivité électrique et d'après l'échelle de salinité (Tab. 3), nous avons pu classer nos échantillons de sol, dont la conductivité électrique est comprise entre 0.51 et 0.77 ms/cm, comme légèrement salé.

**Tableau 3.** La salinité de sol en fonction de leur conductivité électrique (Gueye, 2013).

Qualité du sol	Non salé	Légèrement Salé	Salé	Très salé	Extrêmement salé
Extrait 1/5 (ms/cm)	<0.50	0.50-1.00	1.00-2.00	2.00-4.00	>4.00

### 1.3. Humidité

D'après Lee et Hwang (2002), l'humidité d'un sol est :

- \* **Faible**, si le pourcentage d'humidité est compris entre 2% et 9% ;
- \* **Modéré**, si le pourcentage d'humidité est compris entre 9.1% et 13% ;
- \* **Elevée**, si le pourcentage d'humidité est compris entre 13.1% et 20%.

Les résultats présentés dans le tableau 1 nous permettent de conclure que les échantillons présentent une humidité variable entre modéré (10%) à élevée (20%).

### 2. Isolement

Les cultures des prélèvements sur milieu PDA ont permis l'obtention de 12 isolats différents. En effet, une grande difficulté est rencontrée à l'énumération des colonies des champignons filamenteux, ainsi qu'à la discrimination de certaines espèces du même genre. Le suivi de leur apparition pendant une semaine est enregistré dans le suivant :

**Tableau 4.** Observations quotidiennes de l'ensemencement des différentes dilutions du sol sur PDA pendant 10 jours.

Echantillons	Dilution	J1	J2	J3	J4	J5	J6	J7	J8	J9	J10
<b>E01</b>	<b>SM</b>	-	-	-	+	++	+++	+++	+++	+++	++++
	<b>10<sup>-1</sup></b>	-	-	-	-	+	+	++	++	+++	+++
	<b>10<sup>-2</sup></b>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
	<b>10<sup>-3</sup></b>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
<b>E02</b>	<b>SM</b>	-	+	+	++	++	++	+++	+++	++++	++++
	<b>10<sup>-1</sup></b>	-	+	+	+	++	++	++	+++	+++	++++
	<b>10<sup>-2</sup></b>	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
	<b>10<sup>-3</sup></b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>E03</b>	<b>SM</b>	-	+	++	++	++	++	+++	+++	++++	++++
	<b>10<sup>-1</sup></b>	-	+	+	+	++	++	++	++	+++	++++
	<b>10<sup>-2</sup></b>	-	-	-	-	-	+	+	+	++	++
	<b>10<sup>-3</sup></b>	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+









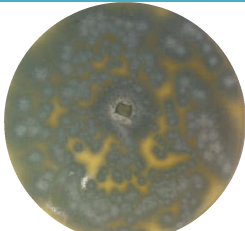

J: jour, - : absence des isolats, + : 1-10 isolats, ++ : 10-20 isolats, +++ : 20-30 isolats, ++++ : supérieur à 30, SM : solution mère.



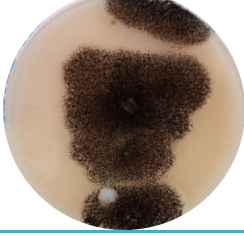
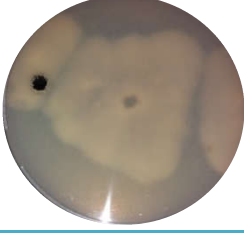


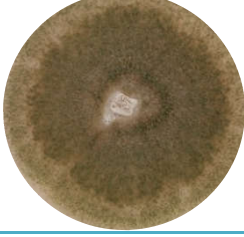
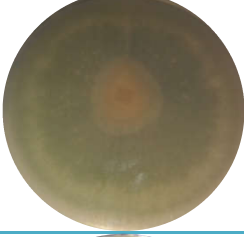

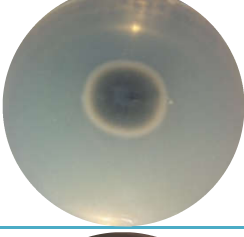



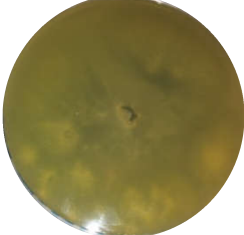
### 3. Identification morphologique

#### 3.1. Identification macroscopique

Au total, trois échantillons de sol ont été examinés pour l'étude de la diversité fongique. L'observation macroscopique est une étude primordiale pour l'identification des moisissures. L'étude macroscopique est réalisée par des observations à l'œil nu et des mesures quotidiennes de la croissance mycélienne de chaque isolat examiné. Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau 5.

**Tableau 5.** Aspect macroscopique des champignons filamenteux isolés du sol de Hammam El-Baraka (El-Hadjeb, Biskra).

Numéro et code de l'isolat	Recto	Caractère macroscopiques	Verso
<b>Isolat N°=01</b> SM.E1.A		<b>Recto :</b> blanche <b>Verso :</b> blanche à centre jaune <b>Croissance :</b> très lente <b>Aspect :</b> cotonneuse <b>Relief de la colonie :</b> plat	
<b>Isolat N°=02</b> SM.E1.B		<b>Recto :</b> blanc à rose <b>Verso :</b> jaune pâle <b>Croissance :</b> lente <b>Aspect :</b> duveteuse <b>Relief de la colonie :</b> plat	
<b>Isolat N°=03</b> SM.E2.A		<b>Recto :</b> gris et bordure blanc <b>Verso :</b> noir et bordure blanc <b>Croissance :</b> rapide <b>Aspect :</b> veloutée <b>Relief de la colonie :</b> plat	
<b>Isolat N°=04</b> SM.E2.B		<b>Recto :</b> blanche <b>Verso :</b> incolore <b>Croissance :</b> rapide <b>Aspect :</b> cotonneuse <b>Relief de la colonie :</b> bombée	
<b>Isolat N°=05</b> SM.E2.C		<b>Recto :</b> vert bleuâtre <b>Verso :</b> vert jaunâtre <b>Croissance :</b> très rapide <b>Aspect :</b> poudreuse <b>Relief de la colonie :</b> plissé	

<b>Isolat N°=06</b> 10 <sup>-1</sup> .E2		<b>Recto</b> : brun <b>Verso</b> : incolore <b>Croissance</b> : très rapide <b>Aspect</b> : laineuse <b>Relief de la colonie</b> : bombée	
<b>Isolat N°=07</b> SM.E3		<b>Recto</b> : noir <b>Verso</b> : incolore <b>Croissance</b> : très rapide <b>Aspect</b> : granuleuse <b>Relief de la colonie</b> : plat	
<b>Isolat N°=08</b> 10-1.E3.A		<b>Recto</b> : vert herbé <b>Verso</b> : vert jaunâtre <b>Croissance</b> : très rapide <b>Aspect</b> : poudreuse <b>Relief de la colonie</b> : plissé	
<b>Isolat N°=09</b> 10-1.E3.B		<b>Recto</b> : vert pâle <b>Verso</b> : vert claire à centre jaune <b>Croissance</b> : très rapide <b>Aspect</b> : duveteuse <b>Relief de la colonie</b> : plat	
<b>Isolat N°=10</b> 10-2.E3.A		<b>Recto et verso</b> : gris à noir et bordure blanc <b>Croissance</b> : très lente <b>Aspect</b> : veloutée <b>Relief de la colonie</b> : plat	
<b>Isolat N°=11</b> 10 <sup>-2</sup> .E3.B		<b>Recto</b> : blanche <b>Verso</b> : blanc à rose <b>Croissance</b> : rapide <b>Aspect</b> : veloutée <b>Relief de la colonie</b> : plat	
<b>Isolat N°=12</b> 10 <sup>-2</sup> .E3.C		<b>Recto</b> : vert noirâtre <b>Verso</b> : incolore <b>Croissance</b> : très rapide <b>Aspect</b> : duveteuse <b>Relief de la colonie</b> : plissé	

### 3.2. Identification microscopique

L'examen microscopique des cultures fongiques effectué par la méthode de scotch au grossissement X40. Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau suivant :

**Tableau 6.** Aspects microscopiques des champignons filamenteux isolés.

Numéro et code de l'isolat	Photomicroscopique	
Isolat N°=04 SM.E2.B		Non identifié

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

Le repiquage de 12 isolats de champignons filamenteux isolés aux différentes concentrations de NaCl (5, 10 et 15%) a permis d'enregistrer les résultats résumés dans le tableau 7.

**Tableau 7.** La tolérance des isolats à la salinité.

Isolats	PDA à 5% NaCl	PDA à 10% NaCl	PDA à 15% NaCl
SM.E.A	+	+	-
SM.E1.B	+	+	+
SM.E2.A	+	+	-
SM.E2.B	+	-	-
SM.E2.C	+	+	-
10 <sup>-1</sup> .E2	+	+	-
SM.E3	+	+	+
10 <sup>-1</sup> .E3.A	+	+	+
10 <sup>-1</sup> .E3.B	+	+	+
10 <sup>-2</sup> .E3.A	+	-	-
10 <sup>-2</sup> .E3.B	+	+	-
10 <sup>-2</sup> .E3.C	+	+	+

+ : croissance, - : pas de croissance.

A une concentration de 5% de NaCl, on a remarqué la croissance mycélienne chez les tous isolats (SM.E.A, SM.E1.B, SM.E2.A, SM.E2.B, SM.E2.C, 10<sup>-1</sup>.E2, SM.E3, 10<sup>-1</sup>.E3.A, 10<sup>-1</sup>.E3.B, 10<sup>-2</sup>.E3.A, 10<sup>-2</sup>.E3.B et 10<sup>-2</sup>.E3.C) et de 10% de NaCl, on a remarqué la croissance mycélienne chez 10 isolats (SM.E.A, SM.E1.B, SM.E2.A, SM.E2.C, 10<sup>-1</sup>.E2, SM.E3, 10<sup>-1</sup>.E3.A, 10<sup>-1</sup>.E3.B, 10<sup>-2</sup>.E3.B et 10<sup>-2</sup>.E3.C), ces résultats permettent de les considérer comme des mycètes halotolérants. A une concentration de 15% de NaCl, on a noté la croissance mycélienne uniquement chez 5 isolats (SM.E1.B, SM.E3, 10<sup>-1</sup>.E3.A, 10<sup>-1</sup>.E3.B et 10<sup>-2</sup>.E3.C), 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.

### 5. Caractérisation physiologique vis-à-vis de la température

Comme travail classique en microbiologie, la sélection des thermophiles nécessite d'observer le comportement du microorganisme à examiner vis-à-vis de la température.

Dans ce contexte, Abdullah et Al-Bader (1990) ont testé l'apparition des isolats fongiques à partir des échantillons du sol d'Iraq. Leurs isolements ont été effectués également sur milieux PDA comme la présente étude avec une incubation à 25, 30, 35, 40, 45, 50 et 55°C. La croissance mycélienne dans chaque boîte a été mesurée après 4 jours d'incubation. Le résultat de cette étude était : seuls les isolats appartenant à l'espèce de *Malbranchea sulphurea*, *Rhizomucor miehei*, *Scytalidium thermophilum*, *Sporotrichum thermophilum*, *Thermomyces lanuginosus* et un du genre *Trichoderma* non identifié sont de véritables thermophiles. Ces isolats ayant une température maximale de croissance égale ou supérieure à 50°C. La majorité des autres espèces sont considérées comme thermotolérantes, car elles se développent à des températures maximales entre 45-50°C, avec un optimum de croissance se situant entre 30-40°C. Le plus important dans cette étude c'est que cinq isolats fongiques appartenant à des espèces différentes sont signalés pour la première fois comme champignons thermotolérants, il s'agit de : *Cunninghamella echinulata*, *Torula terrestris*, *Gilmaniella macrospora*, *Emericella* sp. et *Cladosporium* sp.. Ces résultats sont proches à ceux obtenus par Pan et al. (2010), qui a travaillé sur un autre site (du parc national de Tengchong Rehai), l'une des zones géothermiques volcaniques les plus connues de la Chine. Dans cette référence, l'auteur a testé la croissance de chaque champignon sur PDA à une température de 15 à 65°C, avec un intervalle de 5°C. L'auteur a observé que tous les isolats thermophiles avaient une température minimale de croissance égale ou supérieure à 25°C, où quelques souches de

l'espèce *Talaromyces thermophilus* et *Thermomyces lanuginosus* ne pouvaient pas croître en dessous de 35°C. En revanche, toutes les souches avaient une température maximale de croissance, minimum 50°C, et certaines d'entre elles (par exemple *T. thermophilus*, *T. lanuginosus* ainsi que *Thermoascus aurantiacus* Miehe var. *levisporus*) poussaient même à 60°C. Sachant que la température optimale pour la croissance en laboratoire des souches thermophiles se situait généralement entre 40 et 50°C.

## **6. Mise en évidence de l'activité hydrolytique**

### **6.1. Activité amylolytique**

Plusieurs travaux sont réalisés sur la production des amylases par la source fongique. Singh et al. (2014) ont isolé des souches fongiques du sol prélevés de différents sites de Jalandhar (Pendjab, Inde) et ils ont examiné leur production en amylase sur un milieu gélosé à base d'amidon « SAM » à 25°C. Après 3 jours d'incubation, la révélation de la production de cette enzyme est effectuée par l'ajout de la solution d'iode de lugol. Au total, 7 souches fongiques se sont révélées positives pour la production d'amylase, par l'observation d'une zone claire (zone d'hydrolyse) formée autour de la colonie productrice. L'analyse des résultats indique qu'*Aspergillus fumigatus* montrée la zone de lyse la plus grande la plus élevée, la confirmation de ce résultat nécessite le dosage de l'enzyme (examen qualitatif). Dans l'étude de Varalakshmi et al. (2009), cinq isolats fongiques ont été examinés pour la production d'amylase, qu'ont été isolés des sols de Bangalore-Inde, de la même manière que l'étude précédente. Le résultat de cette étude était : l'isolat d'*A. niger* JGI 24 s'est révélé être le meilleur producteur d'amylase.

Une souche de moisissure appartenant à l'espèce *Aspergillus niger* est avérée la plus productrice parmi toutes les souches testées dans l'étude de Haq et al. (2005). En effet, l'activité amylolytique de cette souche est plus élevée comparée aux autres souches de la même espèce dans les publications précédentes.

### **6.2. Activité cellulolytique**

Commençant par le travail de Shruthi et al. (2019), qu'ont effectué leur prélèvement à partir de sol de Kadapa-Inde. Pour tester la production de cellulase, leurs isolements ont été effectués sur milieu CMC-Agar (Carboxy-Methyl-Cellulose-Agar). L'apparition de la zone claire autour de la colonie examinée après coloration avec une solution de rouge Congo à 0.1% était une preuve de la sécrétion de cellulases extracellulaires. Sur neuf isolats, seuls deux qui ont présenté une zone de lyse. *Aspergillus unguis* a présenté le diamètre de la zone le plus grand (5.0 cm). Une autre recherche sur l'activité cellulolytique des champignons

filamenteux est publiée par Saroj et al. (2018). Ils ont isolé des champignons thermophiles à partir de sol de Warangal, Inde sur Czapek-Dox contenant 1% de Carboxy-Méthyl-Cellulose (CMC) comme substrat inducteur de la production de cellulases. L'activité cellulolytique est déterminée par mesure de l'indice d'activité enzymatique (Annexe 03). Les isolats fongiques présentant des valeurs d'IE supérieur à 1.01, ont été considérés comme des producteurs potentiels de cellulases extracellulaires. Parmi les quinze champignons isolés, *A. fumigatus* et *Aspergillus terreus* ont présenté la plus forte activité de cellulase avec des valeurs IE de 1.50 et 1.24, respectivement, suivis par *Aspergillus* sp. (IE : 1.13), *Fusarium verticillioides* (IE : 1.11) et *Eurotium rubrum* (IE : 1.09). Toutefois, l'activité cellulolytique de d'autres isolats était relativement faible, notamment *Aspergillus caespitosus* (IE : 1.05), *Aspergillus oryzae* (IE : 1.05), *Rhizopus* sp. (IE : 1.05), *Aspergillus nidulans* (IE : 1.03), *Aspergillus nomius* (IE : 1.03), *Fomitopsis africana* (IE : 1.03), *Fomitopsis* sp. (IE : 1.03), *Pleurotus pulmonarius* (IE : 1.03), *Aspergillus flavus* (IE : 1.02), et *Aspergillus ochraceus* (IE : 1.02).

Khokhar et al. (2012) avec ces résultats, il a été signalé qu'*Aspergillus* sp. possède tous les composants nécessaires du système enzymatique de la cellulase.

### 6.3. Activité pectinolytique

Phutela et al. (2005) s'étaient intéressés au criblage des champignons thermophiles isolés des sols collectés de différents sites (Inde). Le criblage des isolats pour la production de pectinases extracellulaires a été réalisé par la méthode de disque. L'indice de l'activité enzymatique (IE) pour chaque isolat est correspond au rapport entre le diamètre de la zone d'hydrolyse et le diamètre de la colonie. Les cultures ont été repiquées individuellement sur milieu YPSS (gélose à l'amidon soluble dans la levure) contenant de la pectine comme inducteur de la production de cette hydrolase, et incubées à 50°C. Le résultat de cette étude était ; quinze cultures avaient un IE supérieur à 3.5, trente-cinq cultures avaient un IE compris entre 3.0 et 3.5, et quarante-trois isolats avaient un IE de 2.0 à 3.0. Ces isolats ont été classés comme producteurs de pectinase élevés, modérés et faibles, respectivement. Sur la base de ces expériences de criblage, l'isolat TF3 s'est révélé être une source potentielle d'enzymes pectinolytiques. L'isolat a été identifié comme *Aspergillus fumigatus* Fres. Banakar et Thippeswamy (2012) ont publié leur travail sur l'isolement des champignons pectinolytiques extracellulaires à partir de sol forestier. Le site de prélèvement des échantillons du sol -le sanctuaire de faune- de Bhadra représente un point chaud dans les Ghâts occidentaux du sud de l'Inde. Les auteurs ont rapporté dans leur publication qu'ils ont suivi la même technique décrite préalablement pour la détecter la production de pectinases extracellulaires rouge



Congo. Dans cette étude, de nombreuses souches de champignons filamenteux ont montré une activité de pectinase importante. L'activité pectinolytique maximale a été observée chez 5 isolats appartenant aux espèces différentes : *Mortierella* sp. suivie par *Syncephalastrum recemosum*, *Aspergillus fumigatus*, *Trichosporiella cerebriformis* et *Paecilomyces marquandii*. Cette étude a permis de constater que le sol forestier est le meilleur habitat pour une biodiversité importante de champignons pectinolytiques et qu'il joue un rôle important dans les cycles biogéochimiques de l'environnement.

#### 6.4. Activité lipolytique

L'étude d'Ayinla et al. (2017) a porté sur le criblage et la production d'une lipase extracellulaire d'un champignon isolé des sols, contaminés par l'huile de palme à Gbogan (Nigeria). Les champignons isolés ont été criblés pour la production de lipase en utilisant une gélose à la tributyrine, et en analysant la formation de zones claires autour des colonies examinées. L'activité lipolytique est déterminée par mesure de la largeur des zones de clairance et celle de la colonie examinée ( $\frac{R}{r}$ ), rayon du halo lipolytique (R) / rayon de la colonie (r). Les souches qui ont présenté un rapport supérieur à 2.0 ont été sélectionnées pour une caractérisation approfondie. Les espèces suivantes : *Rhizopus oryzae*, *Aspergillus glaucus*, *Mucor mucedo*, *Scopulariopsis brevicaulis* provenant du sol contaminé ont montré leur potentiel de production de lipase. Le résultat donne également une indication que les moisissures sont répandues dans l'environnement contaminé par l'huile de palme. Le sol a présenté aussi un habitat important pour l'isolement des champignons filamenteux en Turquie (Cihangir et Sarikaya, 2004). Dans cette étude, les isolements ont été effectués à partir des échantillons du sol collectés de différentes régions Turquies, dont la production de lipase a été testée par la même méthode décrite dans les travaux précédents à partir de 30 échantillons différents, 18 souches isolées ont montré un résultat positif, où 11 souches ont présenté une forte activité lipolytique sur la base de leur comparaison de l'amplitude de la zone claire. Une activité lipolytique remarquable est notée chez les souches du genre *Aspergillus*.

#### 6.5. Activité protéolytique

Palanivel et al. (2013) ont testé la production de protéases extracellulaires par le criblage des souches de moisissures isolées à partir de sol de Namakkal d'Inde. La capacité de production de protéase a été déterminée sur le lait gélosé ou sur l'agar caséiné. Les champignons ont été isolés par la méthode des plaques étalées, les boîtes ont été examinées quotidiennement pour l'observation d'une zone ou un halo clair autour des colonies. L'activité protéolytique est déterminée en calculant le ratio entre le diamètre de la colonie et le halo.

Parmi l'ensemble des isolats, les souches d'*Aspergillus* spp. ont montré une activité protéolytique très élevée. Trois souches de différentes espèces d'*Aspergillus*, une souche de *Mucor* et une souche de *Curvularia* ont montré une activité protéolytique dans les deux milieux. L'étude de Mohamed Abdullah Maitig et al. (2018), qui ont travaillé sur la même enzyme, en utilisant la même technique de détection ont rapporté que parmi 44 champignons isolés de sol (Petaling Jaya de Malaisie), la majorité des isolats ont montré leur capacité de production de protéases. Cette étude a montré aussi que les isolats du genre *Aspergillus* ont présenté le diamètre de la zone d'hydrolyse le plus élevé.

---

# Conclusion

---

## Conclusion

Ce travail a été mené dans le but d'isoler des champignons filamenteux extrêmophiles ; choisissant comme milieux extrême Hammam El-Baraka de la commune d'El-Hadjeb (Biskra). Ce travail a également comme objectif la caractérisation approfondie de chaque isolat de moisissure.

L'étude physicochimique a montré que les échantillons du sol collectés représentent réellement un milieu extrême par rapport aux paramètres suivants ; l'alcalinité du pH et sa salinité élevée. Ces conditions peuvent présenter l'avantage d'isoler des extrêmophiles, qui vivent très souvent dans des milieux dont les conditions physicochimiques sont extrêmes.

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

La caractérisation des isolats vis-à-vis de la salinité (NaCl) à prouver le caractère de « halotolerant » chez tous les isolats. Bien que cette partie doit être compléter par un repiquage à 0 % ; la concentration permettant de distinguer entre les halotolérants et halophiles.

Pour la partie pratique non réalisée à cause du Covid-19 (caractérisation physiologique vis-à-vis de la température et le profil hydrolytique de chaque isolat), on a essayé de discuter quelques articles (14 articles) travaillant sur le même sujet. Comme conclusion retirée de ces travaux ; les champignons filamenteux sont des microorganismes peuplant différents types du sol, et ils peuvent servir comme une bonne source de production d'hydrolases à intérêt biotechnologique.

Les conclusions retirées ouvrent des nouvelles perspectives pour :

- \* l'identification au niveau moléculaire de chaque isolat prouvé comme extrêmophile (thermophiles et halophiles).
- \* L'identification et l'optimisation des conditions de production des enzymes par les extrêmophiles.

---

# **Bibliographie**

---

## Bibliographie

### - A -

- Abdullah, S. K., & Al-Bader, S. M. 1990. On the thermophilic and thermotolerant mycoflora of. *Sydowia*, 42(1), 1-7.
- Ait Abdelouahab N. 2001. Microbiologie alimentaire. Office des publications universitaires, 52 p.
- Aubert G., 1978. Méthodes d'analyses des sols. FAO, France. 191p.
- Ayinla, Z., Ademakinwa, A. N., & Agboola, F. K. 2017. Studies on the Optimization of Lipase Production by *Rhizopus* sp. ZAC3 Isolated from the Contaminated Soil of a Palm Oil Processing Shed. *Journal of Applied Biology & Biotechnology*, 5(02), 30-37.

### - B -

- Bååth E., Söderström B.E. 1980. Comparaisons of the agar-film and membranefilter methods for the estimation of the hyphal lengths in soil , with particular reference to the effect of magnification .*Soil Biol. Biochem.* 12 :385-387.
- Banakar, S. P., & Thippeswamy, B. 2012. Isolation, production and partial purification of fungal extracellular pectinolytic enzymes from the forest soils of Bhadra Wildlife Sanctuary, Western Ghats of Southern India. *J Biochem Tech*, 3(5), 138-143.
- Benmessaoud N. 2010. Biodiversité fongique du sable de Plage (Beau Séjour, Eden, les Andalouses et Madagh) du Littoral algérien. Mémoire de magistère, Université d'Oran, Oran, 155p.
- Bhat M. K. 2000. Cellulases and related enzymes in biotechnology. *Biotechnology advances*, 18(5), 355-383.
- Blackwell, M., R. Vilgalys et J.W. Taylor, 1998. Fungi, Eumycota. In *The Tree of Life*, D.R. Maddison et W.P. Maddison editor, University of Arizona.
- Boiron, P. 1996. Organisation et biologie des champignons. Edition Nathan. P : 13-19-69-79.
- Bonnefoy C., Guillet F., Leyral G., Verne E. et Bourdais. 2002. Microbiologie et qualité dans les industries agroalimentaires. Doin, France, p150.

- Bornscheuer T. 2002. Microbialcarboxylesterases. Classification, properties, and application in biocatalysis. *FEMS MicrobiologyReviews*, P: 73-81.
- 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.
- 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. 2ème édition. Masson. Collection Biotechnologies, p : 34-428.
- Bouchemal F et Achour S. 2015. Qualite physico-chimique et parametres depollution des eaux souterrainesde la region de biskra. *Larhyss Journal* (n°22), pp. 197-212.
- Bouchet P. H., Guignard J.L., Villard J. 1999. Les champignons, Mycologie fondamentale et appliquée. Ed. Masson, Paris. 194p.
- 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.
- C -
- Calvet R. 2000. Le sol propriétés et fonctions, constitution et structure phénomènes aux interfaces. Tome 1. Edition France agricole. Paris (France), pp. 83-90.
- Chabasse D. 2008. Classification des champignons d'intérêt médical. *EncyclMédChir* (Editions scientifiques et Médicales Elsevier SAS, Paris), Maladies infectieuses, 8-088-B-10, 9p.
- Chabasse D., Bouchara J.P., DE Gentile L., Brun S., Cimon B., Penn P. 2002. Les moisissures d'intérêt médical. Cahier de formation n°25, Bioforma. 59p
- 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.*

Cihangir, N., & Sarikaya, E. 2004. Investigation of lipase production by a new isolate of *Aspergillus* sp. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 20(2), 193-197.

- D -

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

Davet P. et Rouxel F. 1997. Détection et isolation des champignons du sol. *INRA*, Paris, p 13-54.

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

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

Dekhinat S., Bensaïd R., Bensid Z., Koreib F., Mouna Y. 2010. Analyse de la variabilité spatiale de la salinité des sols dans une palmeraie algérienne (Biskra, Algérie). *Sciences & Technologie* (31) : 9-14

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.

Denis B. 1988. Guide des analyses courantes en pédologie. *INRA*, Paris, p. 20.

Denis B., 2000. Guide des analyses en pédologie 2eme édition revue et augmentée. Edition *INRA*.

Drouin M., 2005. Etude de production de protéases alcalines par *Bacillus licheniformis* en utilisant des boues d'épuration municipales comme substrat. Mémoire de Maître sciences (M.Sc.).Canada.

- E -

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 Japanese soil may be transported by Kosa event (Asian dust storm). *Saline Systems*, 1:8.

Figarella J., Leyral A. et Terret M. 2007. Microbiologie technique (Dictionnaire des techniques. Centre régional de documentation pédagogique d'Aquitaine, Bordeaux, p 24-25.

- F -



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 bruchida-amylase and structural explanation of observed specificities. *Eu. J. Biochem* (267): 2166-2173.

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

### - G -

Ganghi N. 1997. Applications of lipase. *JAOCS*, 621-634.

Gao J., Weng H., Zhou D., Yuan M., Guan F., Xi Y. 2008. Production and characterization of cellulolytic enzymes from the thermoacidophilic fungal *Aspergillusterreus* M11 under solide state cultivation of corn stover. *BioressourTechnol.* 99: 7623-7629.

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.

Gueye I., 2013. Application de la télédétection aérospatiale pour l'évolution de la dégradation des ressources naturelles : cas des sols de la région de Kaolack située dans le bassin arachidier du Sénégal. Université Cheikh Anta DIOP de Dakar.

Guiraud J. P. 1998. Microbiologie alimentaire. Dunod. Paris. P. 7-330.

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

### - H -

Habbeche A. 2014. Purification et caractérisation d'une kératinase thermostable KERAK-29 chez une nouvelle souche d'Actinomycète. Thèse de doctorat d'état, Université Badji Mokhtar, Annaba, 120p.

Haq, I.-, Ashraf, H., Qadeer, M. A., & Iqbal, J. 2005. Pearl millet, a source of alpha amylase production by *Bacillus licheniformis*. *Bioresource Technology*, 96(10), 1201-1204.

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

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

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

Horvath I.T., Horvath I. 2002. *Encyclopedia of catalysis*, John Wiley & Sons Ed. 4772 P.

- I -

Indge B. 2004. *La biologie de A à Z. 1100 définitions, édition : Dunod*, Paris, P344.

- J -

Jaeger K.E. & Reetz M.T., 1998. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. *Trends Biotechnol.*, 16, 396-403.

Jayani R.S., Saxena S. & Gupta R., 2005. Microbial pectinolytic enzymes: a review. *Process Biochem.*, 40, 2931-2944.

- K -

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

Khokhar, I., Saleem Haider, M., Mushtaq, S., & Mukhtar, I. 2012. Isolation and Screening of Highly Cellulolytic Filamentous Fungi. *J. Appl. Sci. Environ. Manage*, 16(3), 223-226.

Korish M. 2003. Production, Purification, Properties and Application of the Cellulase from a Wild type Strain of a Yeast isolate. Faculty of Biology, Johannes Gutenberg-University, Mainz, Germany.

Kristjansson J.K. and Hreggvidsson G.O. 1995. Ecology and habitats of extremophiles. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*; vol. 11, pp. 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.

Kushner DJ. 1978. Life in high salt and solute concentrations: halophilic bacteria, In *Microbial life in extreme environments*. Kushner DJ. (Eds.). London: United Kingdom. Academic Press. p. 317– 368.

- L -

- Larsen H. 1986. Halophilic and halotolerant microorganisms. An overview and historical perspective. *FEMS Microbiol Lett.*, 39:3–7.
- Lecellier A. 2013. Caractérisation et identification des champignons filamenteux par spectroscopie vibrationnelle. Thèse de doctorat d'état, université de Reims Champagne-Ardenne, France, 194p.
- Lee J. Y., Hwang B. K. 2002. Diversity of antifungal actinomycetes in various vegetative soils of Korea. *Can. J. Microbiol.* 48:pp. 407-417.
- 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, université constantine 1 & université de reimschampagne-ardenne .134 p.
- Lekchiri S., Moueqqit M., Lekchiri A. 2006. Mise en évidence d'une activité cellulase chez *Fusarium oxysporum* f. *spalbedinis* induite par une nouvelle forme d'hydrocellulose purifiée. Faculté des Sciences, Département de Biologie, Faculté des Sciences, Université Mohamed Ier, Oujda, Maroc.
- M -
- Madigan M.T. and Martino J.M. 2006. Brock Biology of Microorganisms, 11th ed.; Pearson Education. Upper Saddle River, NJ, USA.
- Madigan M.T., Martinoko J.M & Parker J. 1997. Brock biology of microorganisms, 8th edn. USA.
- 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.
- Mats M. & Karl H., 1994. Kinetics of triglyceride lipase. *In*: Wooley P. & Petersen S.B., eds. Lipases. Cambridge, UK: Cambridge University Press, 159-180.
- Mehravar M. & Sardari S. 2011. Screening of antimicrobial membrane-active metabolites of soil microfungi by using chromatic phospholipid/polydiacetylene vesicles. *Journal of Medical Mycology*, 21 (3): 188-197.

- Meziani, A., et Mahcene, H. 2017. Activités hydrolases des souches fongiques. Production par fermentation de cellulase et d' $\alpha$ -amylase par *Penicillium*. Sp sur substrat solide.
- Mohamed Abdullah Maitig, A., A.M. Alhoot, M., & Tiwari, K. 2018. Isolation and screening of extracellular protease enzyme from fungal isolates of soil. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 12(4), 2059-2067.
- 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.
- N -
- Nabors, M. 2008. *Biologie végétale*. Paris: Pearson Education, 614p.
- Najjar A. 2010. Etude quantitative de la sécrétion de lipase, de la lipolyse et du stockage de lipides chez *Yarrowialipolytica* lors de sa croissance en présence d'huile d'olive. Thèse. Microbiologie et Biotechnologies.
- Nasraoui B., 2015. Les champignons et pseudo-champignons pathogènes des plantes cultivées : Biologie, Nouvelle systématique, Interaction pathologique. Publication de l'INAT, 180 p, Tunisie.
- Nicklin J., Graeme-Cook K., Paget T., Killington R. 2000. L'essentiel en microbiologie. Edition Berti. P : 210-216.
- Nicklin J., Graeme-Cook K., Paget T., Killington R. 2000. L'essentiel en microbiologie. Edition Berti. pp. 210-216.
- Niehaus, F., Bertoldo, C., Kahler, M., and Antranikian, G. 1999. Extremophiles as a source of novel enzymes for industrial application. *Appl Microbiol Biotechnol* 51: 711-729.

- O -

- Oteng-Gyang K. 1984. Introduction à la microbiologie alimentaire dans les pays chaud. Lavoisier. Paris. P. 26-42.

- P -

- Palanivel, P., Ashokkumar, L., & Balagurunathan, R. 2013. PRODUCTION, purification and fibrinolytic characterization of alkaline protease from extremophilic soil fungi. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 4(2), 101-110.
- Pan, W.-Z., Huang, X.-W., Wei, K.-B., Zhang, C.-M., Yang, D.-M., Ding, J.-M., & Zhang, K.-Q. 2010. Diversity of thermophilic fungi in Tengchong Rehai national park revealed by ITS nucleotide sequence analyses. *The Journal of Microbiology*, 48(2), 146-152.
- Pandey, A., Nigam, P., Soccol, C. R., Soccol, V. T., Singh, D. and Mohan, R. 2000. Advances In: Microbial amylases. *Biotechnology Applied Biochemistry* (31), 135-152.
- Peciulyte D. 2007. Isolation of cellulolytic fungi from waste paper gradual recycling materials. *Ekologija*, 53: 11–18.
- Peduzzi R., Tonolla M., Boucher-Rodoni R. 2006. Milieux extrêmes : Conditions de vie en milieu alpin et milieu marin, Actes et contributions scientifiques : 9.
- Pereira E., Santos A., Reis F., Tavares R.M., Baptista P., Lino-Neto T. & Almeida-Aguiar C. 2013. A new effective assay to detect antimicrobial activity of filamentous fungi. *Microbiological Research*, 168 (1): 1-5.
- Peuk A.D. 2000. The chemical composition of xylensapin *Vitis vinifera* L. cv. Riesling during vegetative growth on three different francian vineyard soils and as influenced by nitrogen fertilizer. *Am. Enol. Viticult.* 51 :329-339.
- Phutela, U., Dhuna, V., Sandhu, S., & Chadha, B. S. 2005. Pectinase and polygalacturonase production by a thermophilic *Aspergillus fumigatus* isolated from decomposing orange peels. *Brazilian Journal of Microbiology*, 36(1), 63-69.
- Pikuta E. V. and Hoover R. B. 2007. Microbial extremophiles at the limits of life. *Crit. Rev. Microbiol.*, 33, pp. 183-209.
- Prescott, Harley et Klein. 1995. Les microorganismes et l'environnement. Dixième partie. In *Microbiologie*. Second edition. DeBoeck Wesmael S.A. Bruxelles. pp : 804-845.

## - Q -

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

## - R -

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

Rinaldi C., Sutton A. & Fothergill S. R. 1998. The morphology of fungi. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 123-129.

Rouahna Houria. 2007. Relation entre les nappes et la salinité dans les sols gypseux de la région de Ain Ben Noui. Biskra [Mémoire de magistère]. Université El hadj lakhdar, Batna. 98p.

Ruark G. H., Zarnoch S. J. 1992. Soil carbon, nitrogen and fine root biomass sampling in a pine stand. *Soil Sc. Soc. Am.J.* 56 :1945-1950.

- S -

S. Dekhinat R. Bensaïd Z. Bensid F. Koreib Y. Mouna. 2010. Analyse De La Variabilité Spatiale De La Salinité Des Sols Dans Une. *Sciences & Technologie, N°31, 6.*

Saroj, P., P, M., & Narasimhulu, K. 2018. Characterization of thermophilic fungi producing extracellular lignocellulolytic enzymes for lignocellulosic hydrolysis under solid-state fermentation. *Bioresources and Bioprocessing, 5(1), 2-14.*

Satyanarayana T., Raghukumar C., Shivaji S., 2005. Extremophilic microbes: Diversity and perspective. *Current Science* 89, 78-90.

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

Scriban R. 1993. *Biotechnologie. 4ème édition. Technique et Documentation – Lavoisier, Paris. P: 40.*

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 gemblouxbelgique. pp.178-194*

Sharma R., Chisti Y. & Banerjee U.C., 2001. Production, purification, characterization, and applications of lipases. *Biotechnol. Adv., 19, 627-662.*

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

Shruthi, K., Yadav, P. S., Prasad, B. V. S., & Chandra, M. S. 2019. Cellulase production by *Aspergillus unguis* in solid state fermentation. *Journal of Forestry Research, 30(1), 205-212.*

Singh, S., Singh, S., Bali, V., Sharma, L., & Mangla, J. 2014. Production of Fungal Amylases Using Cheap, Readily Available Agriresidues, for Potential Application in Textile Industry. *BioMed Research International*, 2014, 1-9.

Smith C.K., Coyea M.R., Munson A.D. 2000 . Soil carbon , nitrogen and phosphorus stocks and dynamics under disturbed black spruce forest. *Ecol. App.* 10 :75-78.

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

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

- T -

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

- U -

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

- V -

Van den Burg, B. 2003. Extremophiles as a source for novel enzymes. *Curr Opin Microbiol* 6: 213-218.

Varalakshmi, K. N., Kumudini, B. S., Nandini, B. N., Solomon, J., R. Suhas, Mahesh And, B., & Kavitha, A. P. 2009. Production and Characterization of  $\alpha$ -Amylase from *Aspergillus niger* JGI 24 Isolated in Bangalore. *Polish Journal of Microbiology*, 58(1), 29-36.

Voet D. et Voet J. G. 2005. *Biochimie.* 2eme édition. Boek. Université. pp. 459-539.

- X -

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

- Z -

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



---

# **Annexes**

---

## Annexes

### Annexe 01. Analyse physicochimique du sol

Composition de milieu de la culture PDA (potato dextrose agar).

Pommes de terre épluchées et coupées	200 g
Glucose	20 g
Agar	20 g
Eau	1000 ml
Gentamicine	50ppm

### Annexe 02. Identification microscopique

#### Lactophénol-bleu coton

Phénol en cristaux	20 g
Acide lactique	20 g
Glycérine	40 g
Eau distillée	20 g
Bleu de méthylène	0.5 g

### Annexe 03. Activité cellulitique

$$\text{Indice enzymatique (IE)} = \frac{\text{Diamètre de la zone d'hydrolyse(en cm)}}{\text{Diamètre de la colonie (en cm)}}$$

### Annexe 04. Les articles utilisés dans la partie incomplète

Abdullah, S. K., & Al-Bader, S. M. 1990. On the thermophilic and thermotolerant mycoflora of *Sydowia*, 42(1), 1-7.

Ayinla, Z., Ademakinwa, A. N., & Agboola, F. K. 2017. Studies on the Optimization of Lipase Production by *Rhizopus* sp. ZAC3 Isolated from the Contaminated Soil of a Palm Oil Processing Shed. *Journal of Applied Biology & Biotechnology*, 5(02), 30-37.

Banakar, S. P., & Thippeswamy, B. 2012. Isolation, production and partial purification of fungal extracellular pectinolytic enzymes from the forest soils of Bhadra Wildlife Sanctuary, Western Ghats of Southern India. *J Biochem Tech*, 3(5), 138-143.

- Cihangir, N., & Sarikaya, E. 2004. Investigation of lipase production by a new isolate of *Aspergillus* sp. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 20(2), 193-197.
- Haq, I., Ashraf, H., Qadeer, M. A., & Iqbal, J. 2005. Pearl millet, a source of alpha amylase production by *Bacillus licheniformis*. *Bioresource Technology*, 96(10), 1201-1204.
- Khokhar, I., Saleem Haider, M., Mushtaq, S., & Mukhtar, I. 2012. Isolation and Screening of Highly Cellulolytic Filamentous Fungi. *J. Appl. Sci. Environ. Manage*, 16(3), 223-226.
- Mohamed Abdullah Maitig, A., A.M. Alhoot, M., & Tiwari, K. 2018. Isolation and Screening of Extracellular Protease Enzyme from Fungal Isolates of Soil. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 12(4), 2059-2067.
- Palanivel, P., Ashokkumar, L., & Balagurunathan, R. 2013. PRODUCTION, purification and fibrinolytic characterization of alkaline protease from extremophilic soil fungi. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 4(2), 101-110.
- Pan, W.-Z., Huang, X.-W., Wei, K.-B., Zhang, C.-M., Yang, D.-M., Ding, J.-M., & Zhang, K.-Q. 2010. Diversity of thermophilic fungi in Tengchong Rehai national park revealed by ITS nucleotide sequence analyses. *The Journal of Microbiology*, 48(2), 146-152.
- Phutela, U., Dhuna, V., Sandhu, S., & Chadha, B. S. 2005. Pectinase and polygalacturonase production by a thermophilic *Aspergillus fumigatus* isolated from decomposing orange peels. *Brazilian Journal of Microbiology*, 36(1), 63-69.
- Saroj, P., P, M., & Narasimhulu, K. 2018. Characterization of thermophilic fungi producing extracellular lignocellulolytic enzymes for lignocellulosic hydrolysis under solid-state fermentation. *Bioresources and Bioprocessing*, 5(1), 2-14.
- Shruthi, K., Yadav, P. S., Prasad, B. V. S., & Chandra, M. S. 2019. Cellulase production by *Aspergillus unguis* in solid state fermentation. *Journal of Forestry Research*, 30(1), 205-212.
- Singh, S., Singh, S., Bali, V., Sharma, L., & Mangla, J. 2014. Production of Fungal Amylases Using Cheap, Readily Available Agriresidues, for Potential Application in Textile Industry. *BioMed Research International*, 2014, 1-9.
- Varalakshmi, K. N., Kumudini, B. S., Nandini, B. N., Solomon, J., R. Suhas, Mahesh And, B., & Kavitha, A. P. 2009. Production and Characterization of  $\alpha$ -Amylase from *Aspergillus niger* JGI 24 Isolated in Bangalore. *Polish Journal of Microbiology*, 58(1), 29-36.

## المخلص

بهدف عزل الفطريات الخيطية من وسط متطرف واختبار إنتاجها لhydrolases ، تم أخذ عينات من تربة حمام البركة بالحاجب بسكرة. حيث أجريت تحليلات فيزيائية وكيميائية لها ، وقد أظهرت هذه الأخيرة pH قلوي قدره 8.36 ، وموصلية كهربائية قدرتها ب 0.66 مللي/سم ، مع نسبة رطوبة عالية تبلغ 13.33%. سمح العزل الذي تم إجراؤه بواسطة طريقة التخفيف في PDA بالحصول على 12 عزلة من الفطريات الخيطية. كما بين اختبار الملوحة أن نسبة 100% ، 83% و 41% من العزلات التي تم فحصها نمت في وسط PDA فيه 5% ، 10% و 15% من ملح الطعام على التوالي. في حين أنه لم يتم إجراء دراسة نشاط التحلل المائي بسبب (Covid19) وتم استبدالها ب synthèse ومناقشة نتائج مقالات علمية.

**الكلمات المفتاحية :** الفطريات الخيطية ، الوسائط المتطرفة ، hydrolases ، التربة ، بسكرة ، ملح الطعام.

## Résumés

Dans le but d'isoler des champignons filamenteux extrêmophiles et de tester leur production en hydrolases, des prélèvements ont été effectués à partir du sol de Hammam El-Baraka (commune El-Hadjeb Biskra). Les analyses physicochimiques du sol ont montré : un pH alcalin (8.36), une conductivité électrique de 0.66 ms/cm, avec un taux d'humidité élevé de 13.33%. L'isolement effectué par la méthode de suspension-dilution sur PDA a permis d'obtenir 12 isolats différents de champignons filamenteux. Le test physiologique de la salinité a montré que 100%, 83% et 41% des isolats examinés sont poussés dans le milieu PDA à 5%, 10% et 15% de NaCl, respectivement. L'étude de l'activité hydrolytique n'a pas été effectuée (Covid19) et elle est remplacée par une synthèse et une discussion des résultats d'articles scientifiques.

**Mots clés :** champignons filamenteux, milieux extrêmes, hydrolases, sol, Biskra, NaCl.

## Abstract

In order to isolate filamentous fungi from an extreme environment and to test their production in hydrolases, samples were taken from the soil of Hammam El-Baraka (commune El-Hadjeb Biskra). The physicochemical analyses of the soil showed that the soil of Biskra has an alkaline pH of 8.36, an electrical conductivity of 0.66 ms/cm, with a high moisture content of 13.33%. The isolation performed by the suspension-dilution method on PDA resulted in 12 isolates of filamentous fungi. The physiological salinity test showed that 100%, 83% and 41% of the isolates examined were grown in PDA medium at 5, 10 and 15% NaCl, respectively. The study of hydrolytic activity has not been carried out (Covid19) and it is replaced by a synthesis and a discussion of the results of scientific articles.

**Keywords :** filamentous fungi, extreme media, hydrolases, soil, Biskra, NaCl.