



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

Réf. : .....

---

Présenté et soutenu par :

**Manel ADJIMI et Anouar KEBKOUB**

Le : 10/07/2019

### Thème

# Activités hydrolases de moisissures isolées du sol des sources thermales

---

### Jury :

Mme. Hayat AOURAGH	MAA	Université de Biskra	Président
Mme. Fatiha BENGUERAICHI	MAA	Université de Biskra	Rapporteur
M. Hakim HEBAL	MAA	Université de Biskra	Examineur

Année universitaire : 2018 - 2019

## Remerciements

Avant toute chose nous remercions Allah tout-puissant de nous avoir donné courage, volonté, patience et santé durant toutes ces années d'étude. Et que grâce à lui ce travail a pu être réalisé.

En second lieu, on remercie chaleureusement notre encadreur Mme. Fatiha BENGUERAICHI, 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.

Nos vifs remerciements vont également aux membres de jury de ce mémoire qui ont accepté de juger ce travail :

Un merci particulier à notre présidente de jury Hayat AOURAGH de nous avoir fait l'honneur d'accepter la présidence du jury de notre mémoire.

Un merci particulier à l'examineur Hakim HEBAL de ce mémoire, pour avoir accepté d'examiner et évaluer notre travail.

Nous tenons à remercier aussi les ingénieures des laboratoires du département de biologie et surtout Mme. Moufida qui a contribué au bon déroulement des travaux pratiques de ce mémoire.

Nos sincères remerciements à toutes les personnes qui nous ont aidés conseillé, orienté et encouragé tout au long de la genèse de ce travail.

# Dédicace

---

**Table des matières**

Liste des Tableaux.....	
Liste des Figures.....	
Liste des abréviations .....	
Introduction .....	1
<b>Première partie : Synthèse bibliographique</b>	
<b>Chapitre 1: Enzymes</b> .....	3
1.1. Généralité.....	3
1.2. Hydrolases .....	3
1.3. Intérêt des enzymes microbiennes .....	3
1.4. Application des hydrolases .....	4
<b>Chapitre 2 : Moisissures</b> .....	8
2.1. Généralité.....	8
2.2. Classification .....	8
2.2.1. Deutéromycètes.....	9
2.3. Cycle de vie des champignons.....	9
2.3.1. Reproduction asexuée .....	9
2.3.2. Reproduction sexuée .....	10
<b>Deuxième partie : Partie expérimentale</b>	
<b>Chapitre 3 : Matériel et Méthodes</b> .....	13
3.1. Echantillonnage .....	13
3.2. Préparation des dilutions .....	13
3.3. Enrichissement.....	14
3.4. Isolement .....	14
3.5. Identification.....	14
3.5.1. Identification macroscopique (Caractères cultureux) .....	14
3.5.2. Identification microscopique (Caractères morphologique) .....	15
3.6. Mise en évidence des activités hydrolases sur milieux gélosés.....	15
3.6.1. Activité cellulolytique.....	15
3.6.2. Activité lactosique .....	15
3.6.3. Activité protéolytique .....	15

---

3.6.4. Activité amylolytique.....	15
<b>Chapitre 4: Résultats et Discussions</b> .....	18
4.1. Isolement .....	18
4.2. Identification.....	18
4.2.1. Identification macroscopique.....	18
4.2.2. Identification microscopique .....	18
4.3. Mise en évidence des activités hydrolases sur milieux gélosés.....	28
4.3.1. Activité cellulolytique.....	28
4.3.2. Activité lactosique .....	30
4.3.3. Activité protéolytique .....	30
4.3.4. Activité amylolytique.....	33
<b>Conclusion</b> .....	36
<b>Bibliographie</b> .....	37
<b>Annexes</b>	

**Liste des Tableaux**

Tableau 1. Utilisation des enzymes dans les différents domaines .....	5
Tableau 2. Les champignons isolés à partir d'échantillons de sol.....	18
Tableau 3. Aspect macroscopique et microscopique de la souche Ech 1. ....	19
Tableau 4. Aspect macroscopique et microscopique de la souche Ech 2. ....	20
Tableau 5. Aspect macroscopique et microscopique de la souche Ech 3. ....	21
Tableau 6. Aspect macroscopique et microscopique de la souche Ech 4. ....	22
Tableau 7. Aspect macroscopique et microscopique de la souche Ech 5. ....	23
Tableau 8. Aspect macroscopique et microscopique de la souche Ech 6. ....	24
Tableau 9. Aspect macroscopique et microscopique de la souche Ech 7. ....	25
Tableau 10. Aspect macroscopique et microscopique de la souche Ech 8. ....	26
Tableau 11. Aspect macroscopique et microscopique de la souche Ech 9. ....	27
Tableau 12. Diamètres (mm) de zones d'hydrolyses de souches testées. ....	28
Tableau 13. L'activité cellulolytique de neuf souches isolées. ....	29
Tableau 14. L'activité protéolytique sur lait gélosé de neuf souches isolées .....	31
Tableau 15. L'activité protéolytique sur gélose à base de Gélatine de neuf souches isolées. .	32
Tableau 16. L'activité amylolytique de neuf souches isolées.....	33

---

## Liste des Figures

Figure 1. Classification des champignons (Carlotti, 2014) .....	9
Figure 2. Cycle de vie des champignons (Roquebert, 2002 modifié) .....	10
Figure 3. Préparation des dilutions .....	13
Figure 4. Les zones d'hydrolyse et le diamètre des colonies sur milieu de cellulose .....	29
Figure 5. Les zones d'hydrolyse et les diamètres de croissance sur milieu de lactose. ....	30
Figure 6. Les zones d'hydrolyse et le diamètre des colonies sur lait gélosé .....	31
Figure 7. Les zones d'hydrolyse et le diamètre des colonies sur milieu de gélatine .....	32
Figure 8. Les zones d'hydrolyse et le diamètre des colonies sur milieu de l'amidon .....	34
Figure 9. Pourcentages d'enzymes produites par les souches testées. ....	34

**Liste des abréviations**

**CMC:** CarboxyMéthylCellulose

**CYA:** Czapek Yeast Agar

**Ech:** Code de la souche

**MEA:** Malt Extract Agar

**PDA:** Potato Dextrose Agar

**Partie**  
**Bibliographique**

## Introduction

Les enzymes d'origine microbienne présentent 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 humaine et animale, les détergents pour lessives, l'industrie des tanneries et l'industrie pharmaceutique.

Les moisissures disposent des potentialités d'applications biotechnologiques très étendues, grâce à une dissémination efficace, une croissance rapide et un arsenal enzymatique très développé. Environ 40% des enzymes industrielles sont d'origine fongique. Appartenant aux enzymes de la famille des hydrolases telles que les protéases, les amylases, les cellulases et les pectinases sont parmi les plus importantes enzymes à l'échelle industrielle, ce qui les rendent l'un des outils-clés des biotechnologies.

Les champignons thermophiles, vue la vitesse de croissance élevée à 50°C, il y a des nombreuses évidences qui suggèrent l'existence d'une corrélation entre la thermophilie des champignons et la thermostabilité des leurs protéines, en particulier de leurs enzymes. Les microorganismes thermophiles ont développés des stratégies très variées pour s'adapter aux contraintes physico-chimique aux quelles ils font face (température, pression, salinité et pH). Les enzymes qui participent à ces stratégies seront sans doute d'un grand intérêt pour intervenir dans les procédés industriels surement travaillant en conditions de haute température.

La thermostabilité des biocatalyseurs est d'une importance capitale pour leur utilisation dans des applications industrielles. De plus, cette thermostabilité prolonge la vie de stockage des enzymes.

Dans ce cadre, les objectifs de notre étude sont :

- d'isoler et d'identifier des souches de moisissures issues du sol des sources thermales (Hammam El Hadjib (Biskra) et le forage de Tiendla (Djamaa) ;
- d'étudier l'activité hydrolase de ces souches fongiques sur des milieux gélosés.

# **Chapitre 1**

## **Enzymes**

## Chapitre 1: enzymes

### 1.1. Généralité

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

Il est possible de retrouver les enzymes dans une gamme variée d'endroits. En fait, tous les êtres vivants contiennent des enzymes dans leurs cellules. Que ce soit chez les humains, les animaux, les insectes, les végétaux ou les organismes microscopiques comme les bactéries, les levures ou les champignons, les enzymes y sont présentes sous bien des formes et bien des types. Il y a les protéases, les amylases, les lipases, les phytases, les cellulases, les hémicellulases, les mannases, les laccases, les lactases et bien d'autres qui ne sont pas nommées (Ole et *al.*, 2002; Sharma et *al.*, 2001).

Les enzymes peuvent être classés selon leur mode d'action spécifique. En industrie, la classe d'enzyme la plus exploitée est celle des hydrolases. (Jaouadi et *al.*, 2010).

### 1.2. Hydrolases

Les enzymes hydrolases ce 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 les classer. 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 enzymes 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).

### 1.3. Intérêt des enzymes microbiennes

La demande mondiale au niveau industriel pour les enzymes d'origine microbienne croît d'une année à l'autre et ce afin d'améliorer certains procédés de fabrications tels que

l'industrie du textile (décoloration de jeans par exemple), la papeterie (procédé de blanchiment de la pâte à papier..), dépollution (attaque des substances phénoliques..), industrie alimentaire (boulangerie,...) (Dvail et *al.*, 2010).

Les microorganismes représentent une source exceptionnelle pour la production des enzymes, dont 40 % de ces substrats qui sont exposés sur le marché sont produits par des souches fongiques (Wu et *al.*, 2006 ; García-Gómez et *al.*, 2009).

Une attention particulière pour les enzymes provenant de microorganismes thermophiles a fait l'objet de plusieurs études.

En effet, les microorganismes thermophiles ont développés des stratégies très variées pour s'adapter aux contraintes physico-chimique aux quelles ils font face (température, pression, salinité et pH). Les enzymes qui participent à ces stratégies seront sans doute d'un grand intérêt pour intervenir dans les procédés industriels surement travaillant en conditions de haute température ou de grande salinité (Gregoire et *al.*, 2009).

#### **1.4. Application des hydrolases**

Les enzymes sont de plus en plus importantes dans le développement industriel durable. Elles ont déjà été utilisées dans le développement des procédés industriels afin d'obtenir des produits sans déchets ou renfermant un minimum de déchets biodégradables. Les entreprises manufacturières devront dans un futur proche prêter une grande attention à la compatibilité des déchets ainsi qu'au recyclage de l'eau utilisée et les enzymes peuvent résoudre un grand nombre de ces problèmes (<http://www.cprac.org/docs/BiotecnologiaFRA.pdf>).

Environ 200 enzymes sont commercialisées dans le marché. Il existe un grand nombre d'enzymes spécifiques qui joue un rôle important dans plusieurs processus industriels à savoir; l'industrie agroalimentaire (jus, lait, paille, plats cuisinés..), l'industrie pharmaceutiques (antibiotiques, vitamines ...), les industries de nettoyage (traitement d'eau, détergents, lessives) (Gassara, 2012).

En effet, elles peuvent remplacer les produits chimiques toxiques ou corrosifs dans quelques procédés. En outre, leur avantage est qu'elles peuvent être utilisées, désactivées et décomposées dans des produits plus simples totalement biodégradables.

Bon nombre de procédés industriels travaillent à haute température ou pression ou dans des conditions hautement acides ou basiques. Les hydrolases peuvent éviter ces conditions extrêmes ainsi que les réactifs corrosifs. Elles travaillent à des températures modérées, à pression atmosphérique et dans des dissolutions proches du pH neutre. Ce sont des catalyseurs

hautement spécifiques qui donnent des produits plus purs dotés de réactions secondaires moindres. (<http://www.cprac.org/docs/BiotecnologiaFRA.pdf>).

**Tableau 1.** Utilisation des enzymes dans les différents domaines

Industrie	Enzyme	Utilisation	Références
Industrie des détergents	Amylases Lipases Cellulases Protéases	- dégradation enzymatique des protéines, de l'amidon et des taches de graisse dans le lavage des vêtements. - utilisation d'enzymes lipolytiques dans les substances pour lave-vaisselle. - utilisation d'enzymes comme tensioactifs.	(Sohail <i>et al.</i> , 2009 ; Prazeres <i>et al.</i> , 2006 ; Joo <i>et al.</i> , 2005) Site web
Industrie textile	Cellulases Amylases	- lavage à la pierre des tissus de type jean. - désencollage enzymatique de tissu tissé à plat en coton. - blanchiment écologique. - décreusage enzymatique des tissus en coton. - dégomme de la soie.	(Kuhad <i>et al.</i> , 2011 ; Kikani et Singh, 2011) Site web
Industrie de l'amidon	Amylases	- production enzymatique de dextrose, de fructose et de sirops spéciaux pour la pâtisserie, la confiserie et les industries des rafraîchissements.	Site web
Industrie de la bière	Amylases	- dégradation enzymatique de l'amidon, des protéines et des glucanes issus du mélange de céréales utilisé pour l'élaboration de la bière.	Site web
Industrie des produits de pâtisserie et de panification	Amylases	- modification enzymatique des hydrates de carbone et des protéines des céréales afin d'améliorer les propriétés du pain.	(Kathiresen et Manivannan, 2006) Site web
Industrie du vin et des jus de fruits	Pectinases	- dégradation enzymatique de la pectine des fruits dans l'élaboration des jus de fruits et des vins.	(Hoondal <i>et al.</i> , 2002) Site web

Industrie alimentaire et des additifs	Lipases Protéases	<ul style="list-style-type: none"> <li>- amélioration des propriétés nutritives et fonctionnelles des protéines animales et végétales.</li> <li>- conversion du lactose du lait et du petit-lait en sucres plus doux et plus facilement digestibles.</li> <li>- production d'arômes de fromage.</li> </ul>	(Gao <i>et al.</i> , 2000 ; Miyamoto <i>et al.</i> , 2002) Site web
Industrie de l'alimentation animale	Cellulases Protéases	-hydrolyse enzymatique de la matière protéique issue des abattoirs afin d'obtenir des farines à haute valeur nutritive destinées à l'alimentation animale.	(Kuhad <i>et al.</i> , 2011 ; Najafi <i>et al.</i> , 2005 ) Site web
Industrie cosmétique	collagénase	production biotechnologique de collagène et d'autres produits d'application aux crèmes de beauté.	Site web
Industrie du papier	Lipases Pectinases Cellulases	<ul style="list-style-type: none"> <li>- dissolution enzymatique des pitches,</li> <li>- blanchiment écologique de la pâte à papier,</li> <li>- contrôle enzymatique de la viscosité des enduits à l'amidon.</li> </ul>	(Berger <i>al.</i> , 2007) Site web
Industrie des huiles et des graisses	Lécithinases Estérases	- hydrolyse enzymatique des graisses et de la lécithine et synthèse des esters.	Site web

# **Chapitre 2**

## **Moisissures**

## Chapitre 2 : moisissures

### 2.1. Généralité

Le terme « moisissures » n'a pas réellement de signification systématique (Roquebert, 1997; Baudry et Brézellec, 2006). Il désigne tous les champignons d'aspect filamenteux ou poudreux (Chantal et Huguette, 2006).

Les moisissures peuvent être définies comme étant des microorganismes hétérotrophes (Nicklin et *al.*, 2000). Ces microorganismes nécessitent une source de carbone et d'azote pour leur développement. Dans la classification du monde vivant, les mycètes constituent un règne distinct de celui des végétaux et des animaux (Chabasse et *al.*, 2002).

Les moisissures sont des champignons filamenteux multicellulaires, dont l'appareille végétatif, le thalle, ce dernier est formé de loges filaments ramifiés et souvent cloisonnés que l'on appelle des hyphes (Nicklin et *al.*, 2000; Pitt et *al.*, 2000; Brézellec et Baudry, 2006). Dans la majorité des cas, la cellule végétative d'un hyphe contient plus d'un noyau, parfois de centaines. La paroi de la plupart des moisissures est chitineuse (Madigan et Martinko, 2007).

Ils sont souvent dotés de propriétés lytiques importantes (cellulolytique, pectinolytique, amylolytique, protéolytique, lipolytique...) qui en font des agents de utiles, affinage des fromages, production d'enzymes,... (Meyer et *al.*, 2004).

### 2.2. Classification

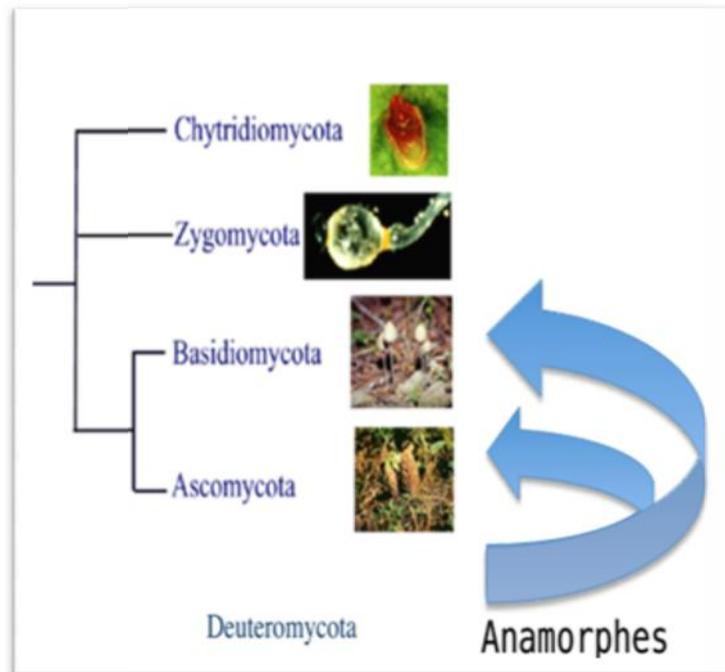
La classification traditionnelle des champignons filamenteux basée sur les critères phénotypiques a été supplantée par le développement des méthodes de biologie moléculaire. La classification phylogénétique basée sur des critères génotypiques a permis une révision et une modification de la classification des champignons filamenteux (Lecellier, 2013).

Les classifications les plus récentes font apparaître les champignons dans le règne unique des eucaryotes et plus précisément dans le groupe des Opisthokonta (Simpson et Roger, 2004; Adl et *al.*, 2005).

Le règne des « champignons vrais » ou « Fungi », appelé Eumycota, comprend actuellement 1 sous-règne, 7 divisions et 10 sous-divisions. (Hibbett et *al.*, 2007)

La classification des champignons est d'abord basée sur un mode de reproduction sexuée ou phase téléomorphe. Ce critère définit quatre des cinq groupes principaux : les chytridiomycètes, les zygomycètes, les basidiomycètes et les ascomycètes. Certaines

moisissures sont le plus souvent ou exclusivement rencontrées à un stade de multiplication asexuée, dit anamorphe. Ces organismes sont alors classés d'après le mode de production des spores asexuées ou conidies. Ces espèces sont classées dans le cinquième ordre, les Deutéromycètes ou Fungi imperfecti (Boudih, 2011).



**Figure 1.** Classification des champignons (Carlotti, 2014)

### 2.2.1. Deutéromycètes

Sont des mycètes imparfaits, la plupart de ces Deutéromycètes, jusqu'ici sont non classifiés, ce sont des Ascomycètes au stade anamorphe (asexué); quelques-uns sont des basidiomycètes (Tortora et *al.*, 2007).

Deutéromycètes comporte un grand nombre de contaminants de végétaux et de produits alimentaires tel que *Trichoderma*, *Cephalosporium*, *Fusarium*, *Geotrichum*, cette classe regroupe aussi les *Penicillium* et les *Aspergillus* (Punt et *al.*, 2002)

### 2.3. Cycle de vie des champignons

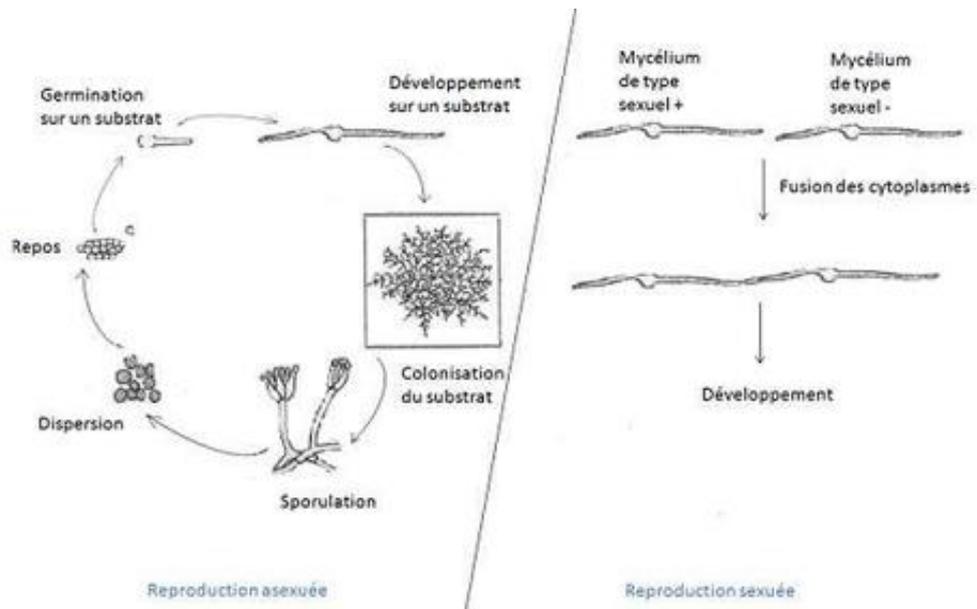
Comprend deux types de reproduction

#### 2.3.1. Reproduction asexuée

au cours de laquelle une spore ou un fragment de mycélium croit et se développe sur un substrat (figure 3). Le mycélium émet des conidiophores à l'extrémité desquels des conidies sont émises puis disséminées.

### 2.3.2. Reproduction sexuée

Implique la rencontre de deux mycéliums de signes sexuels opposés. Un mycélium à  $n$  chromosomes va rencontrer un autre mycélium à polarité complémentaire pour donner lieu à la fusion des cytoplasmes, ce qui engendre un nouveau mycélium à  $2n$  chromosomes. Les cycles de vie diffèrent d'un champignon à un autre selon leur type de spores (Boudih, 2011).



**Figure 2.** Cycle de vie des champignons (Roquebert, 2002 modifié)

# **Partie**

# **Expérimentale**

# **Chapitre 3**

## **Matériel et méthodes**

### Chapitre 3 : Matériel et Méthodes

Le présent travail a été réalisé au niveau du laboratoire pédagogique du département des sciences de la nature et de la vie à El Hadjeb, l'université de Biskra. Il consiste à la mise en évidence des activités hydrolases des moisissures isolées du sol des sources thermale et à l'identification de ces souches.

#### 3.1. Echantillonnage

Les échantillons de sol ont été prélevés dans deux stations de sources thermales situées dans deux régions l'une à Biskra, Hammam EL Hadjeb, et l'autre à Djamaa, forage de Tiendla.

Au site d'échantillonnage, le sol a été débarrassé de tout débris (plantes, racines, pierres), puis une quantité suffisante (15-20g) de sol a été prélevée à l'aide d'une spatule stérile et mis dans des flacons stériles. Ces derniers sont déposés dans une glacière et transportés rapidement au laboratoire.

#### 3.2. Préparation des dilutions

En respectant l'ensemble des règles d'asepsie de manière à éviter toute contamination. Une quantité de 1g de sol est mis en suspension dans 9ml d'eau physiologique stérile (NaCl 0.9 g / ml) puis le mélange est agité au vortex pendant 10 min. Cette solution est considérée comme une solution mère.

Une série de dilutions est préparée dans des tubes de 9ml de l'eau physiologique stérile. Les dilutions sont réalisées à partir de la solution mère jusqu'à  $10^{-5}$ .

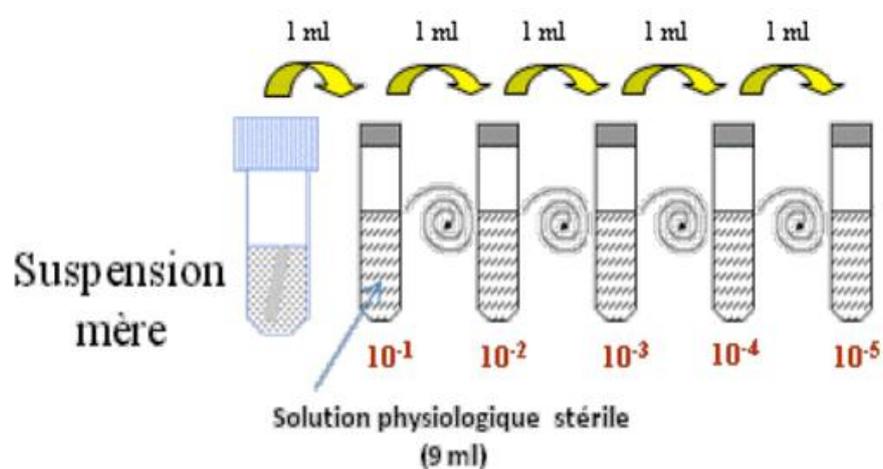


Figure 3. Préparation des dilutions

### 3.3. Enrichissement

Le milieu de culture PDA est coulé en des boîtes de Pétri sous des conditions stériles. Après la gélification de la gélose, un volume de 0.1 ml de chacune des dilutions indiquées ci-dessus est ensemencée dans une boîte de Pétri (en triplicata) puis incubée à 28° C pendant 7 jours.

### 3.4. Isolement

Les souches obtenues, après l'ensemencement de différentes dilutions, est repiquée par touche sur le PDA jusqu'à l'obtention d'une souche pure dans chaque boîte de Pétri. Le PDA contient l'antibiotique gentamycine à une concentration de 50 p.p.m. La gentamicine a été choisie pour les raisons suivantes:

- elle possède un large spectre d'inhibition de bactéries,
- elle peut être stérilisée avec le milieu (Botton *et al.*, 1999) et
- sa disponibilité

### 3.5. Identification

L'identification des champignons filamenteux en routine repose essentiellement sur l'analyse des caractères macroscopiques et microscopiques.

#### 3.5.1. Identification macroscopique (Caractères culturaux)

Les isolats fongiques sont soumis à une identification macroscopique par examen de la culture sur le milieu PDA, Czapek Yeast Agar (C.Y.A) et le milieu extrait de malt (MEA) (voir l'annexe) (Cahagnier, 1998). L'examen permet de déterminer les caractères culturaux suivants :

- la couleur de colonies est un élément pertinent d'orientation, plusieurs couleurs sont existés comme le blanc, le jaune, le vert, le brun allant jusqu'au noir, ces couleurs sont examinées en recto (surface) et en verso (revers). (Chabasse *et al.*, 2002).
- l'aspect de colonies représente un critère très important d'identification. Les champignons filamenteux forment des colonies duveteuses, laineuses, cotonneuses, veloutées, poudreuses ou granuleuses ; parfois certaines colonies peuvent avoir une apparence glabre (l'absence ou pauvreté du mycélium aérien). (Chabasse *et al.*, 2002).
- la vitesse de la croissance et la taille des colonies peut-être très variable en fonction des genres fongiques (Chabasse *et al.*, 2002).

### **3.5.2. Identification microscopique (Caractères morphologique)**

Cette identification est basée sur l'observation sous microscope, l'objectif x40 est suffisant pour mettre en évidence les éléments importants. (Chabasse et *al.*, 2002).

En plus des caractères cultureux, des fractions de culture ont été observées en microscopie optique sur une lame porte objet ordinaire. L'observation a été faite sur des cultures de 120 heures et a porté sur les caractéristiques suivantes : les hyphes, les conidies, les phialides, les conidiophores.

On prend un fragment de scotch (technique de drapeau), que l'on colle sur le bord de la colonie de la souche étudiée, puis qu'on décolle délicatement. On le recolle ensuite sur une lame sur laquelle est préalablement étalée une goutte de lactophénol (Nguyen, 2007).

### **3.6. Mise en évidence des activités hydrolases sur milieux gélosés**

Notre souches sont repiquées à l'aide d'une anse de platine sur différents milieux pour tester la production des enzymes hydrolases extracellulaires puis les boîtes de Pétri sont incubées pendant 7 jours à 30°C. Après l'incubation et la croissance des moisissures, l'apparition d'une zone claire autour des colonies témoigne de l'hydrolyse du substrat testé, le diamètre de cette zone est lié à la quantité des enzymes produites par les moisissures. Les mesures sont effectuées à partir du deuxième jusqu'au septième jour.

#### **3.6.1. Activité cellulolytique**

Cette activité est évaluée sur milieu contenant 3% de carboxyméthylcellulose (Annexe 2).

Après l'incubation et la croissance des souches, les boîtes sont colorées avec une solution au rouge Congo (0.1 %) pendant 30 min puis sont lavées avec une solution de NaCl (1M) pendant 1 heure (Annexe 3). L'apparition de zones claires autour des colonies indique la présence de cellulases extracellulaires.

#### **3.6.2. Activité lactosique**

Cette activité est examinée sur milieu contenant 1% de lactose. L'apparition d'halo clair autour des colonies indique la présence des -galactosidases.

#### **3.6.3. Activité protéolytique**

L'étude de cette activité est réalisée sur deux milieux de différentes protéines lait gélosé et gélatine à 5 % (Annexe 2).

#### **3.6.4. Activité amylolytique**

La détection de l'activité amylolytique est effectuée sur milieu de culture à base d'amidon 1% (Annexe 2). Après incubation, les colonies sont pulvérisées avec la solution de lugol diluée pendant 30 secondes puis rincées à l'eau distillée (Annexe 3). L'eau iodée contenant l'iode qui se complexe avec l'amidon et donne une couleur bleu sombre. Les souches à halo clair sur le pourtour, sont considérées comme productrices d'amylases.

# **Chapitre 4**

## **Résultats et Discussions**

## Chapitre 4: Résultats et Discussions

### 4.1. Isolement

Après 7 jours d'incubation nous avons procédé au dénombrement des unités formant des colonies de champignons. Les cultures des prélèvements sur milieu PDA ont permis d'isoler quatre isolats différents de champignons filamenteux et cinq isolats de levure à partir du premier échantillon du sol, tandis que cinq isolats différents de moisissures ont été obtenus à partir du deuxième échantillon. Les résultats des isolements sont présentés dans le tableau 2.

**Tableau 2.** Les champignons isolés à partir d'échantillons de sol.

Echantillon	moisissures	Levures
Echantillon 1	4 isolats	5 isolats
Echantillon 2	5 isolats	/

### 4.2. Identification

Dans le but de déterminer le genre et même l'espèce de nos isolats, une observation macroscopique et microscopique au grossissement  $\times 400$  est effectuée. Cette étude est suivie par une comparaison de nos résultats (photos) aux clés d'identifications.

#### 4.2.1. Identification macroscopique

Les souches isolées ont été identifiées sur le milieu de culture PDA, milieu gélose au malt et le milieu CYA par observation des caractères cultureux au septième jour d'incubation. Les clés majeures utilisées étaient : la vitesse de croissance (diamètre des colonies), la couleur des colonies, l'envers de la colonie et la texture de la surface de la colonie.

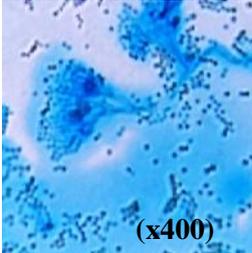
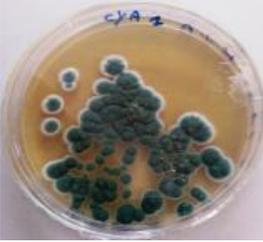
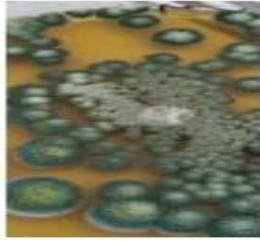
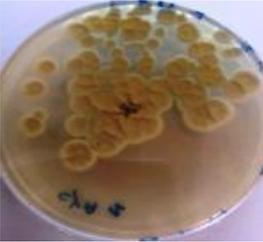
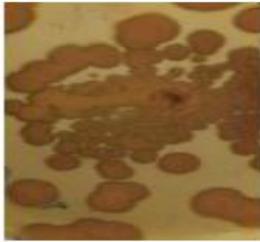
#### 4.2.2. Identification microscopique

Cette identification est basée sur les caractères suivantes : les hyphes, les conidies, les phialides, les conidiophores.

Il est difficile de trancher à l'identification d'espèce de plusieurs genres, en se basant uniquement sur les caractères morphologiques (macroscopiques et microscopiques). L'identification de l'espèce avec précision nécessite des analyses complémentaires. Néanmoins, et malgré leur grande plasticité, ces critères morphologiques restent toujours à la base, de toute identification (Bouregghda, 2009).

L'étude macroscopique et microscopique de la souche Ech 1 est présentée au tableau 3.

**Tableau 3.** Aspect macroscopique et microscopique de la souche Ech 1.

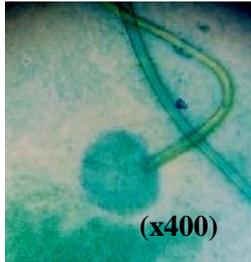
Souche	PDA	CYA	MEA	Aspect microscopique
Ech 1	<b>Recto (surface)</b>			 (x400)
				
	<b>Verso (revers)</b>			
				
<p>- <b>caractères macroscopique</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Vitesse : modérément rapide</li> <li>- Recto : vert</li> <li>- Aspect : poudreuse</li> <li>- Pigment : jaune</li> </ul> <p>- <b>caractères microscopique</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Conidiophores dressés, ramifiés, terminés des phialides.</li> <li>- Phialides : sont disposées en verticilles.</li> <li>- Une rangée de métules.</li> <li>- Conidies restent en chaîne et contribuent à donner à la tête conidienne un aspect en pinceau.</li> </ul>				

Les résultats obtenus sont comparés à ceux décrits dans la littérature (Chabasse et al., 2002 ; Pitt and Hocking, 2009 ; Mônica Cristina et al., 2016). L'analyse de ces résultats a révélé que la souche Ech 1 appartient au genre *Penicillium*.

- Ech 1: *Penicillium spp1*

L'étude macroscopique et microscopique de la souche Ech 2 est présentée au tableau 4.

**Tableau 4.** Aspect macroscopique et microscopique de la souche Ech 2.

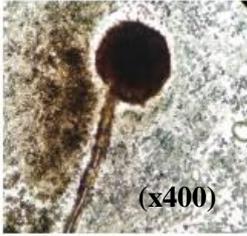
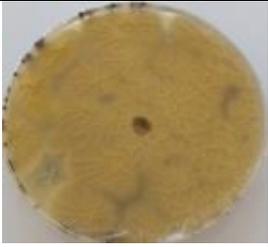
Souche	PDA	CYA	MEA	Aspect microscopique
Ech 2	<b>Recto (surface)</b>			 (x400)
				
	<b>Verso (revers)</b>			
				
<p><b>- caractères macroscopique</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Vitesse : modérément rapide</li> <li>- Recto : jaune d'or</li> <li>- Aspect : poudreuse</li> <li>- Pigment : jaune à brun</li> </ul> <p><b>- caractères microscopique</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-Têtes conidiales étroitement emballées.</li> <li>-Métules et phialides sur toute la surface.</li> <li>-Conidies à parois jaunâtres à brun pâle à grossièrement visibles.</li> </ul>				

Les résultats obtenus sont comparés à ceux décrits dans la littérature (Pitt and Hocking, 2009). L'analyse de ces résultats a révélé que la souche Ech 2 appartient au genre *Aspergillus*.

**- Ech 2: *Aspergillus ochraceus***

L'étude macroscopique et microscopique de la souche Ech 3 est présentée au tableau 5.

**Tableau 5.** Aspect macroscopique et microscopique de la souche Ech 3.

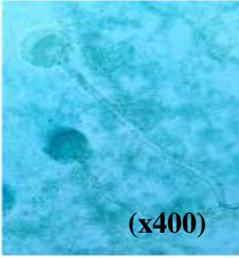
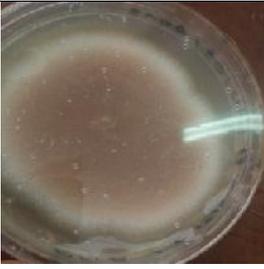
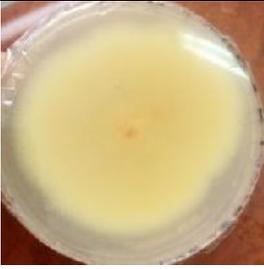
Souche	PDA	CYA	MEA	Aspect microscopique
Ech 3	<b>Recto (surface)</b>			 (x400)
				
	<b>Verso (revers)</b>			
				
	<p><b>- caractères macroscopique</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Vitesse : rapide</li> <li>- Recto : noire</li> <li>- Aspect : granuleuse</li> <li>- Pigment : pas de pigment</li> </ul> <p><b>- caractères microscopique</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Têtes conidiennes bisériées, radiées, noire à maturité.</li> <li>- Vésicules globuleuses.</li> <li>- Phialides insérées sur la vésicule par l'intermédiaire de métules disposées sur tout le pourtour de la vésicule.</li> </ul>			

Les résultats obtenus sont comparés à ceux décrits dans la littérature (Chabasse et al., 2002). L'analyse de ces résultats a révélé que la souche Ech3 appartient au genre *Aspergillus*.

**- Ech 3: *Aspergillus niger***

L'étude macroscopique et microscopique de la souche Ech 4 est présentée au tableau 6.

**Tableau 6.** Aspect macroscopique et microscopique de la souche Ech 4.

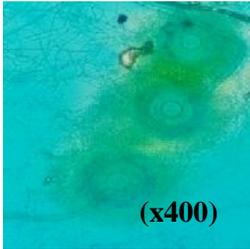
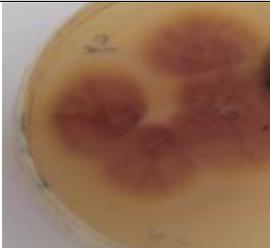
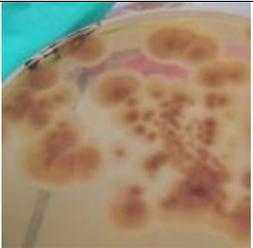
Souche	PDA	CYA	MEA	Aspect microscopique
Ech 4	<b>Recto (surface)</b>			 (x400)
				
	<b>Verso (revers)</b>			
				
	<p><b>- caractères macroscopique</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Vitesse : modérément rapide</li> <li>- Recto : brun noisette à cannelle</li> <li>- Aspect : duveteuse à poudreuse</li> <li>- pigment : jaune</li> </ul> <p><b>- caractères microscopique</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Tête aspergillaire bisériée, en colonne évasée (éventail).</li> <li>- Vésicules globuleuses.</li> <li>- Phialides portées par des métules insérées surtout sur la partie supérieure de la vésicule.</li> </ul>			

Les résultats obtenus sont comparés à ceux décrits dans la littérature (Chabasse et *al.*, 2002). L'analyse de ces résultats a révélé que la souche Ech 4 appartient au genre *Aspergillus*.

**-Ech 4: *Aspergillus terreus***

L'étude macroscopique et microscopique de la souche Ech 5 est présentée au tableau 7.

**Tableau 7.** Aspect macroscopique et microscopique de la souche Ech 5.

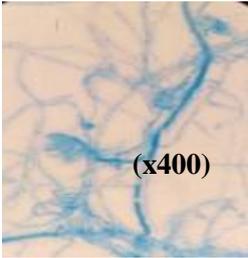
Souche	PDA	CYA	MEA	Aspect microscopique
Ech 5	<b>Recto (surface)</b>			 (x400)
				
	<b>Verso (revers)</b>			
				
	<p><b>- caractères macroscopique</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Vitesse : modérément rapide</li> <li>- Recto : brun pâle à brun jaune</li> <li>- Aspect : granuleuse</li> <li>- Pigment : rose au violet</li> </ul> <p><b>- caractères microscopique.</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Têtes conidiales étroitement emballées.</li> <li>- Métules et phialides sur toute la surface.</li> <li>- Conidies à parois jaunâtres à brun pâle à grossièrement visibles.</li> </ul>			

Les résultats obtenus sont comparés à ceux décrits dans la littérature (Pitt and Hocking, 2009). L'analyse de ces résultats a révélé que la souche Ech 5 appartient au genre *Aspergillus*.

**- Ech 5: *Aspergillus ochraceus***

L'étude macroscopique et microscopique de la souche Ech 6 est présentée au tableau 8.

**Tableau 8.** Aspect macroscopique et microscopique de la souche Ech 6.

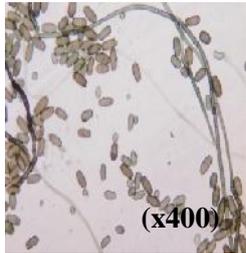
Souche	PDA	CYA	MEA	Aspect microscopique
Ech 6	<b>Recto (surface)</b>			
				
	<b>Verso (revers)</b>			
				
<p><b>- caractères macroscopique</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Vitesse : rapide</li> <li>- Recto : blanchâtre</li> <li>- Aspect : laineuse</li> <li>- Pigment : rose</li> </ul> <p><b>- caractères microscopique</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Les filaments suivent un trajet très anguleux, et des ramifications courtes.</li> </ul> <p>les macroconidies sont absentes.</p>				

Les résultats obtenus sont comparés à ceux décrits dans la littérature (Amoura et Baz, 2014 ; Dufresne, 2018). L'analyse de ces résultats a révélé que la souche Ech 6 appartient au genre *Trichophyton*.

**- Ech 6 : *Trichophyton spp***

L'étude macroscopique et microscopique de la souche Ech 7 est présentée au tableau 9.

**Tableau 9.** Aspect macroscopique et microscopique de la souche Ech 7.

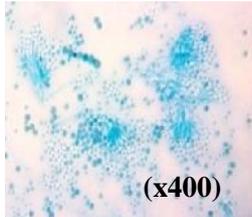
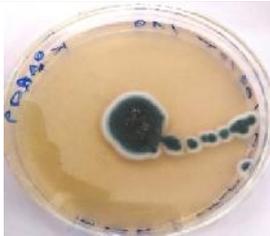
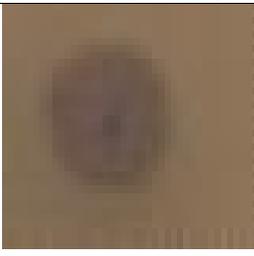
Souche	PDA	CYA	MEA	Aspect microscopique
Ech 7	<b>Recto (surface)</b>			 (x400)
				
	<b>Verso (revers)</b>			
				
<p>- <b>caractères macroscopique</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Vitesse : rapide</li> <li>- Recto : brun foncé à noire</li> <li>- Aspect : duveteuse</li> <li>- Pigment : noire</li> </ul> <p>- <b>caractères microscopique</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Hyphe, septé deviennent rapidement brun foncé.</li> <li>- Conidiophores, simple, brun, géniculés.</li> <li>- Conidies naissent de part et d'autre de la partie terminale du conidiophore.</li> <li>- Certain conidies émettent un tube germinatif à partir des cellules terminales.</li> </ul>				

Les résultats obtenus sont comparés à ceux décrits dans la littérature (Chabasse et *al.*, 2002). L'analyse de ces résultats a révélé que la souche Ech 7 appartient au genre *Bipolaris*.

- **Ech 7: *Bipolaris australiensis***

L'étude macroscopique et microscopique de la souche Ech 8 est présentée au tableau 10.

**Tableau 10.** Aspect macroscopique et microscopique de la souche Ech 8.

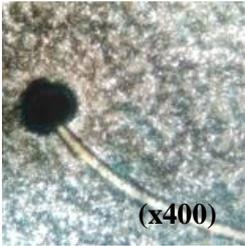
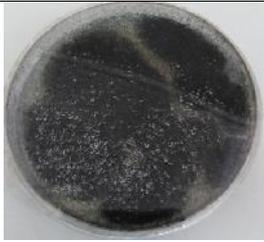
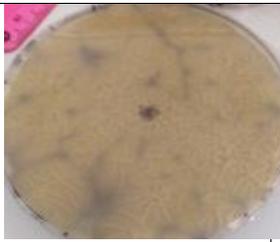
Souche	PDA	CYA	MEA	Aspect microscopique
Ech 8	<b>Recto (surface)</b>			 (x400)
				
	<b>Verso (revers)</b>			
				
	<p><b>- caractères macroscopique</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Vitesse : modérément rapide</li> <li>- Recto : vert</li> <li>- Aspect : poudreuse</li> <li>- pigment : jaune</li> </ul> <p><b>- caractères microscopique</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Conidiophores dressés, ramifiés, terminés des phialides.</li> <li>- Phialides : sont disposées en verticilles.</li> <li>- Une rangée de métules.</li> <li>- Conidies restent en chaîne et contribuent à donner à la tête conidienne un aspect en pinceau.</li> </ul>			

Les résultats obtenus sont comparés à ceux décrits dans la littérature (Chabasse et al., 2002 ; Pitt and Hocking, 2009 ; Mônica Cristina et al., 2016). L'analyse de ces résultats a révélé que la souche Ech 8 appartient au genre *Penicillium*.

**- Ech 8: *Penicillium spp2***

L'étude macroscopique et microscopique de la souche Ech 9 est présentée au tableau 11.

**Tableau 11.** Aspect macroscopique et microscopique de la souche Ech 9.

Souche	PDA	CYA	MEA	Aspect microscopique
Ech 9	<b>Recto (surface)</b>			 (x400)
				
	<b>Verso (revers)</b>			
				
<p><b>- caractères macroscopique</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Vitesse : rapide</li> <li>- Recto : noire</li> <li>- Aspect : granuleuse</li> <li>- Pigment : pas de pigment</li> </ul> <p><b>- caractères microscopique</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Têtes conidiennes bisériées, radiées, noire à maturité.</li> <li>- Vésicules globuleuses.</li> <li>- Phialides insérées sur la vésicule par l'intermédiaire de métules disposées sur tout le pourtour de la vésicule.</li> </ul>				

Ajoutez le grossissement sur toutes les photos de l'aspect microscopique

Les résultats obtenus sont comparés à ceux décrits dans la littérature (Chabasse et al., 2002). L'analyse de ces résultats a révélé que la souche Ech 9 appartient au genre *Aspergillus*.

**- Ech 9: *Aspergillus niger***

### 4.3. Mise en évidence des activités hydrolases sur milieux gélosés

La recherche qualitative de l'activité enzymatique elle s'effectue typiquement en se basant sur la capacité de la souche fongique isolée de croître sur des milieux de culture à base d'une seule source de nutrition.

La détermination de cette activité est basée sur la mesure du diamètre de l'anneau claire qui se forme autour de la colonie fongique. Le diamètre de cette zone est lié à la quantité des enzymes extracellulaires produites par les moisissures. Les mesures sont effectuées à partir du deuxième jusqu'au septième jour (tableau 12).

**Tableau 12.** Diamètres (mm) de zones d'hydrolyses de souches testées.

	Cellulase		Lactase		Protéase		Gélatinase		Amylase	
	ZH	DC	ZH	DC	ZH	DC	ZH	DC	ZH	DC
<i>Penicillium.spp1</i>	5	23	/	9	0	22	8	24	7	28
<i>A.ochraceus</i>	8	27	/	10	8	30	6	29	4	25
<i>A.niger</i>	3	45	/	22	5	70	1	65	2	40
<i>A.terreus</i>	8	35	/	7	3	20	11	36	2	25
<i>A.ochraceus</i>	9	15	/	15	2	27	15	31	5	16
<i>Trichophyton.spp</i>	/	/	/	20	/	+	9	44	2	23
<i>B.australiensis</i>	2	70	/	53	/	+	5	48	3	50
<i>Penicillium.spp2</i>	4	32	/	29	1	41	27	33	2	38
<i>A.niger</i>	3	40	/	22	7	/	2	43	2	12

+ Envahissement du milieu

/ Absence de la zone d'hydrolyse

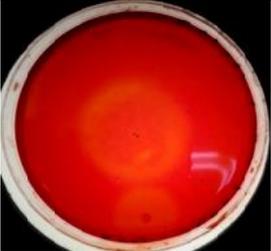
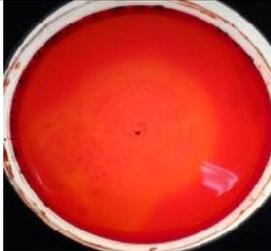
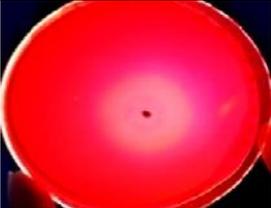
ZH : Zone d'Hydrolyse

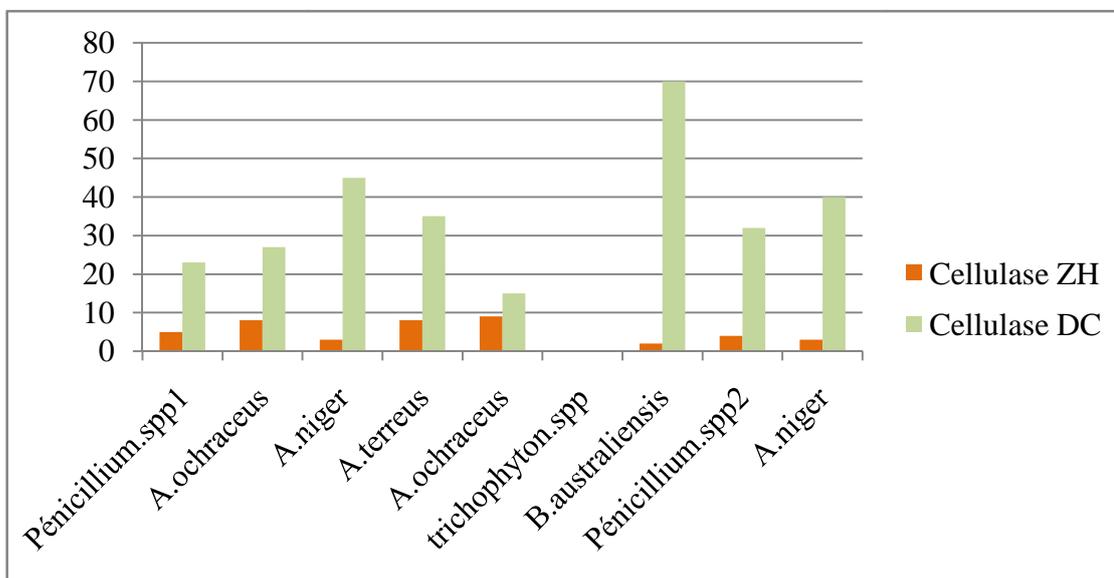
DC : Diamètre de la Colonie

#### 4.3.1. Activité cellulolytique

Les résultats obtenus après l'ensemencement des milieux gélosés à base de cellulose, donnent des zones d'hydrolyse de diamètres différents suivant la capacité de chaque souche à dégrader ce substrat (tableau 13).

**Tableau 13.** L'activité cellulolytique de neuf souches isolées.

<i>Penicillium spp1</i>	<i>A.ochraceus</i>	<i>A.niger</i>
		
<i>A.terreus</i>	<i>A.ochraceus</i>	<i>Trichophyton.spp</i>
		/
<i>B.australiensis</i>	<i>Penicillium spp2</i>	<i>A.niger</i>
		



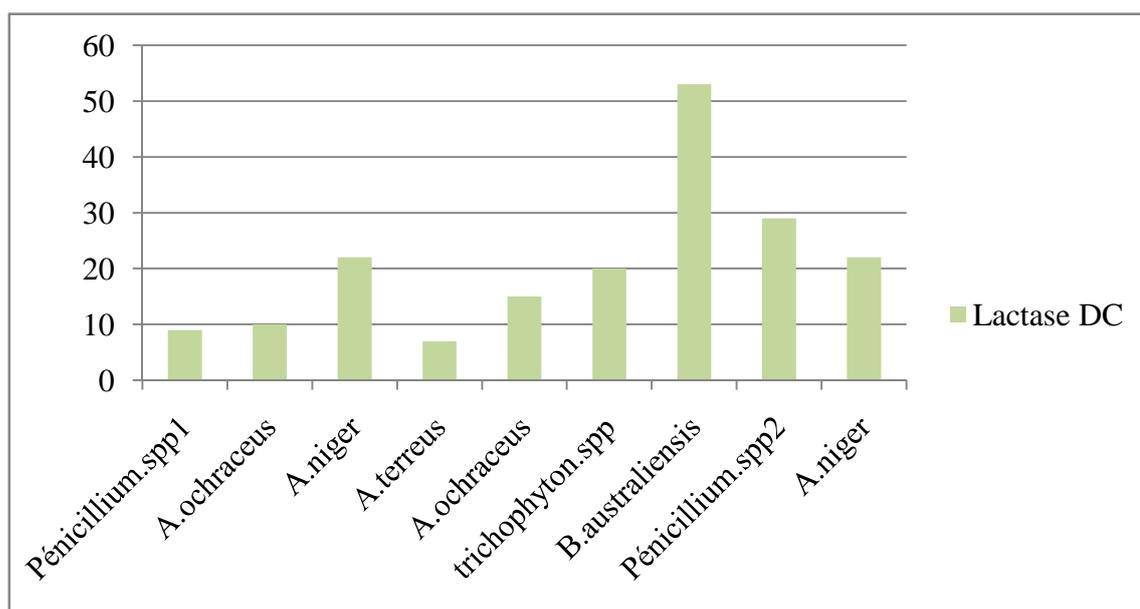
**Figure 4.** Les zones d'hydrolyse et le diamètre des colonies sur milieu de cellulose

Selon les résultats indiqués dans les tableaux 12 et 13 et la figure 4, 8 souches présentent une activité cellulolytique dont la plus élevée est celle des souches *Aspergillus ochraceus* et *Aspergillus terreus*. Cependant, l'activité cellulolytique présentée par ces souches est faible.

Les souches fongiques cellulolytiques, les plus étudiées sont : *Aspergillus* ont subi un nombre d'études considérable en ce qui concerne leurs enzymes cellulolytiques. Les plus étudiés étant: *Aspergillus* et *Trichoderma* (Kitamoto et al.,1996 ; Lokington et al.,1997 ; Riou et al., 1998; Fujita et al.,2002 )

Les *Trichoderma* et les *Aspergillus* ont connus de longue date pour leurs activités cellulolytiques, elles sont considérées parmi les souches fongiques les plus cellulolytiques (Petersson et al., 1981 ; Kubicek., 1998).

#### 4.3.2. Activité lactosique



**Figure 5.** Les zones d'hydrolyse et les diamètres de croissance sur milieu de lactose.

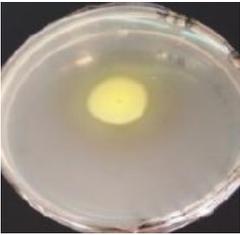
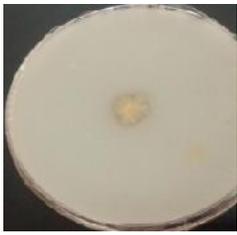
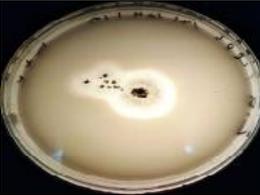
A partir l'histogramme ci-dessus (figure 5), aucune souche n'a d'activité lactosique. Ce résultat ressemble à celui présenté par Beghoul et Hammoudi (2016) qu'ont montrés que parmi les 22 souches testées pour la production de la -galactosidase, aucune n'est révélée positive pour ce test.

#### 4.3.3. Activité protéolytique

L'étude de cette activité est réalisée sur deux milieux de différentes protéines, lait gélosé et gélatine à 5 % (Annexe 2).

4.3.3.1. Lait gélosé

Tableau 14. L'activité protéolytique sur lait gélosé de neuf souches isolées.

<i>Penicillium spp1</i>	<i>A.ochraceus</i>	<i>A.niger</i>
		
<i>A.terreus</i>	<i>A.ochraceus</i>	<i>Trichophyton.spp</i>
		
<i>B.australiensis</i>	<i>Penicillium.spp2</i>	<i>A.niger</i>
		

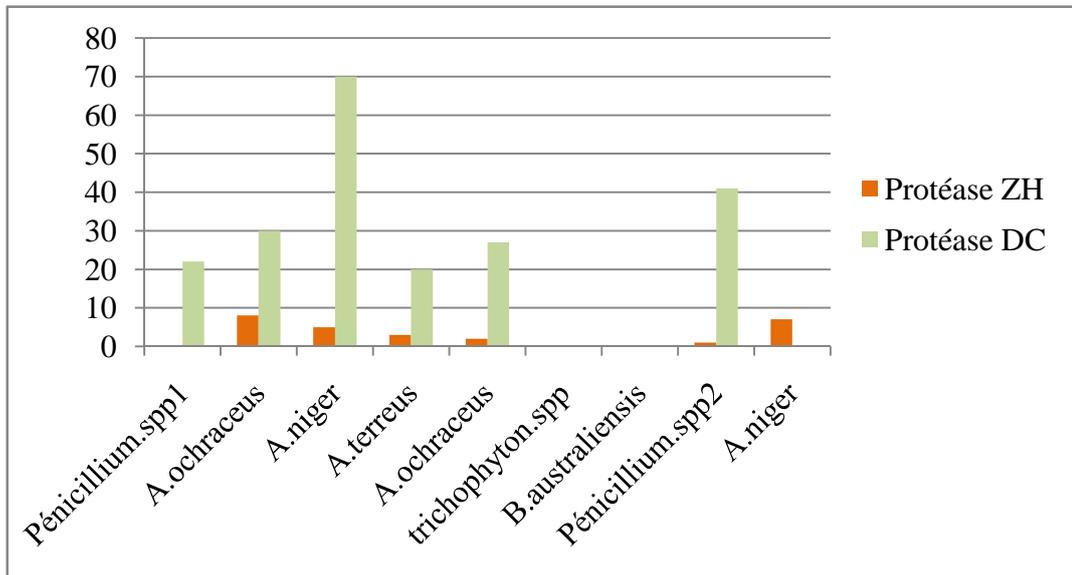


Figure 6. Les zones d'hydrolyse et le diamètre des colonies sur lait gélosé

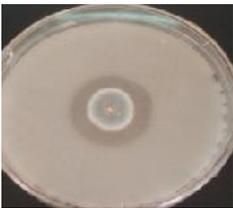
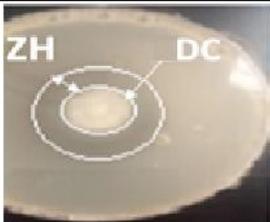
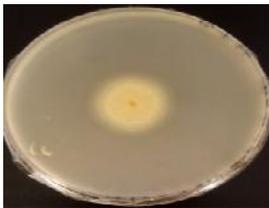
Après l'analyse de notre résultats qui basé sur la figure 6 et les tableaux 12 et 14 on observe *A.ochraceus* et *A.niger* ont l'activité la plus élevé. *A.terreus*, *A.ochraceus* et *Penicillium spp2* ont une faible activité. Pour les souches *Trichophyton spp* et *B.australiensis*,

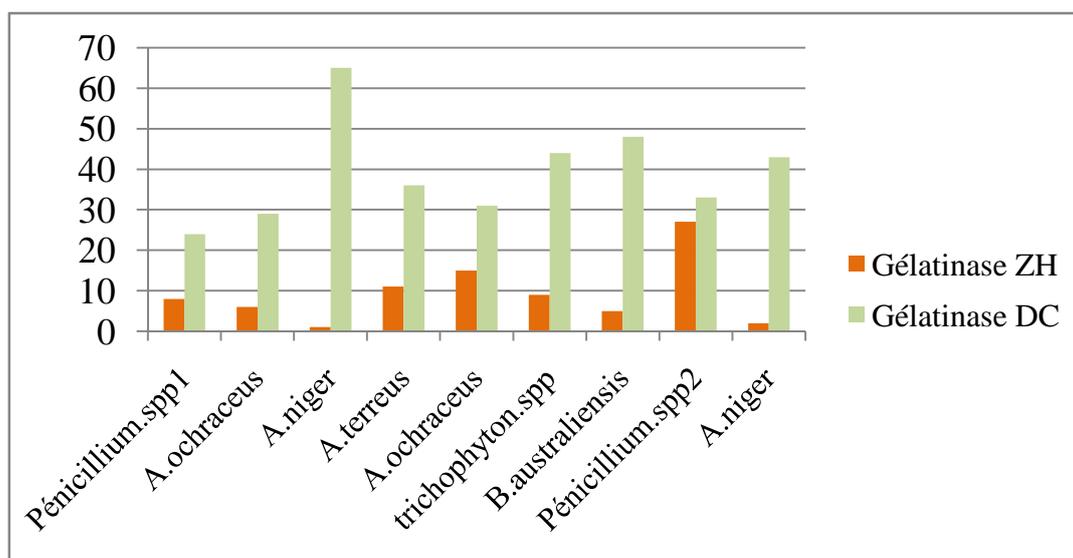
il est difficile de mesurer la zone d'hydrolyse à cause de leur croissance rapide (Envahissement du milieu).

Ces résultats sont en accord avec ceux présentés par Kellil S. (2015) pour la recherche des moisissures coagulant le lait à partir du sol qui se trouve à proximité de laiterie de Boudouaou (Boumerdes).

### 4.3.3.2. Gélatine

**Tableau 15.** L'activité protéolytique sur gélose a base de Gélatine de neuf souches isolées.

<i>Penicillium spp1</i>	<i>A.ochraceus</i>	<i>A.niger</i>
		
<i>A.terreus</i>	<i>A.ochraceus</i>	<i>Trichophyton.spp</i>
		
<i>B.australiensis</i>	<i>Penicillium.spp2</i>	<i>A.niger</i>
		



**Figure 7.** Les zones d'hydrolyse et le diamètre des colonies sur milieu de gélatine.

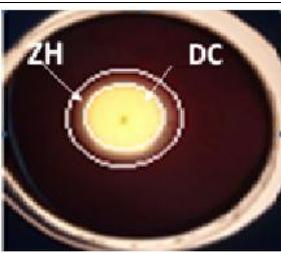
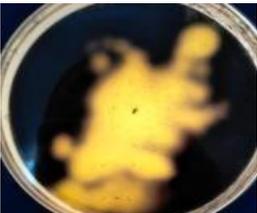
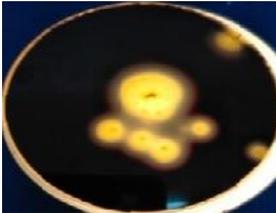
Selon les tableaux 12 et 15 et la figure 7, on peut conclure que la souche la plus productrice de gélatinasse est la souche *Penicillium spp2*.

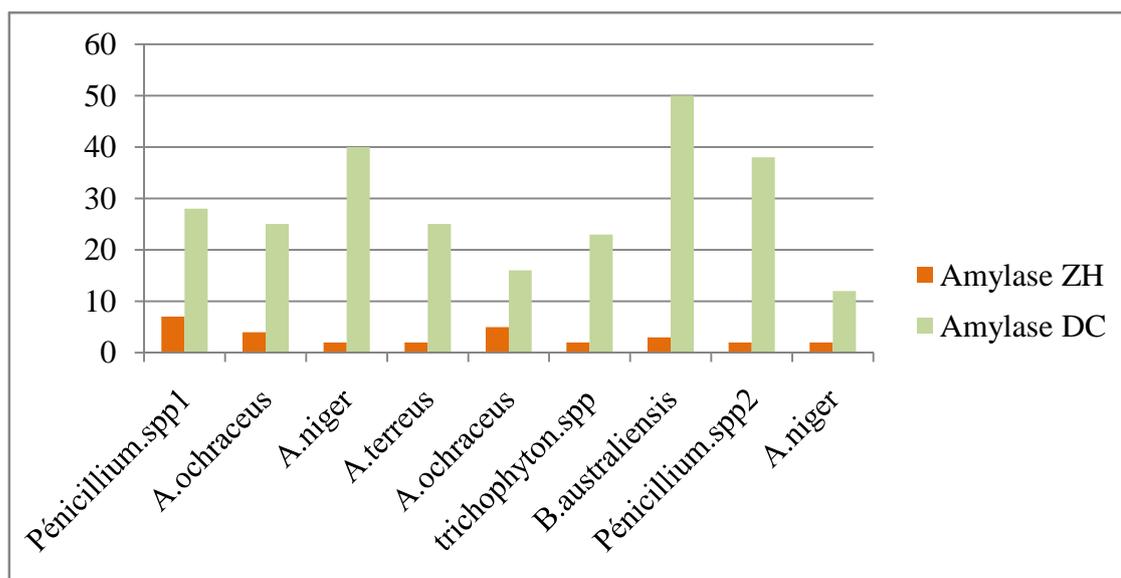
Cordova (1998) a obtenu 44 souches de moisissures gélatinolytiques prélevées à partir du sol entourant des usines au Mexique.

#### 4.3.4. Activité amyolytique

Pour tester la production de l'amylase en utilise l'amidon comme seul substrat et les résultats obtenus sont présentés dans tableau 16.

**Tableau 16.** L'activité amyolytique de neuf souches isolées.

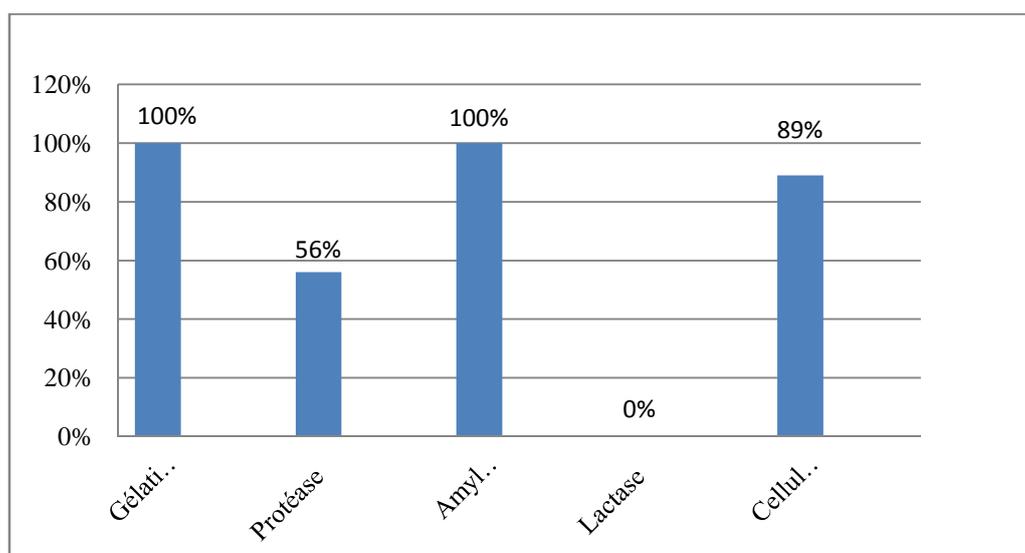
<i>Penicillium spp1</i>	<i>A.ochraceus</i>	<i>A.niger</i>
		
<i>A.terreus</i>	<i>A.ochraceus</i>	<i>Trichophyton.spp</i>
		
<i>B.australiensis</i>	<i>Penicillium.spp2</i>	<i>A.niger</i>
		



**Figure 8.** Les zones d'hydrolyse et le diamètre des colonies sur milieu de l'amidon

D'après la figure 8 et les tableaux 12 et 16, la souche la plus productrice est *Penicillium spp2* avec 7 mm d'un diamètre.

Plusieurs espèces du genre *Penicillium* telles que *P. fellutanumet* et *P. notatum* sont productrices d' -amylase, comme a été montré par les études de Kathiresan et Mannivanan (2006) ; Ertan et Balkan (2007). Aussi, le travail de Meziani et Mahcene (2017) montre que la souche *Penicillium sp* est caractérisée par une activité amylolytique élevée avec une zone d'hydrolyse de diamètre de 10 mm. Une autre étude de Tatsinkou et *al.* (2005) a décrit la capacité de certaines souches fongiques produisant de l'alpha amylase dans les mêmes conditions expérimentales que celles décrites dans ce travail.



**Figure 9.** Pourcentages d'enzymes produites par les souches testées.

Les souches testées ont présenté quatre activités sur les 5 recherchées dont la plus remarquable est l'activité de la gélatinase et amylase avec les 9 souches (100%) et une activité important de cellulase (89%) avec 8 souches. Ainsi ces moisissures ont présenté une activité protéolytique considérable 56%.

## Conclusion

L'objectif de notre travail consiste à l'isolement, l'identification et la mise en évidence de l'activité hydrolase des souches de moisissures isolées du sol de deux sources thermales l'une est d'Hammame El Hadjeb (Biskra) et le forage de Tiendla (Djamaa).

Les cultures des prélèvements sur milieu PDA ont permis d'isoler quatre souches différentes de champignons filamenteux et cinq souches de levure à partir du premier échantillon du sol, tandis que cinq souches différentes de moisissures ont été obtenues à partir du deuxième échantillon.

Après l'ensemencement et l'isolement, neuf souches différentes ont été obtenus. Les examens macroscopiques et microscopiques de ces souches ont montré qu'elles appartiennent aux 4 genres différents : *Aspergillus*, *Penicillium*, *Bipolaris*, *Trichophyton*. Les genres les plus dominants sont *Aspergillus* et *Penicillium*.

Les souches testées ont montré quatre activités sur les 5 recherchées dont la plus remarquable est l'activité de la gélatinase et amylase avec les 9 souches (100%) et une activité important de cellulase (89%) avec 8 souches. Ainsi ces moisissures ont présenté une activité protéolytique considérable 56%.

Cette contribution à l'étude de l'activité des enzymes hydrolases de souches fongiques a donné des résultats encourageants qui devront être complétés par les perspectives suivantes :

- identification moléculaire et caractérisation des souches actives ;
- purification et étude des caractéristiques des enzymes pour une future exploitation à l'échelle industrielle ;
- optimisation des paramètres de production de ces enzymes.

## Bibliographie

- ) Adl S.M., Simpson A.G., Farmer M.A., Andersen R.A., Anderson O.R., Barta J.R., Bowser S.S., Brugerolle G., Fensome R.A., Fredericq S., James T.Y., Karpov S., Kugrens P., Krug J., Lane C.E., Lewis L.A., Lodge J., Lynn D.H., Mann D.G., McCourt R.M., Mendoza L., Moestrup O., Mozley-Standridge S.E., Nerad T.A., Shearer C.A., Smirnov A.V., Spiegel F.W., Taylor M . 2005.F.The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 52, 399-451.
- ) Baudry C. et Brezellec H. 2006. *Microbiologie, immunologie*. Wolters Kluwer. France. p. 36-38.
- ) Beghoul B ., Hammoudi I . 2016. Mesure de l'activité proteolytique, polysaccharidique et lipidique des souches mycéliennes isolées d'un sol salé.
- ) Bensmail S. 2012. Optimisation de la production de la protéase acide par *Aspergillus niger* sur milieu solide : purification et caractérisation. Thèse de Magister, Université M'Hamed Bougara de Boumerdès, Algérie, 140 p.
- ) Berger E, Zhang D, Zverlov VV, Schwarz WH .2007. Two noncellulosomal cellulases of *Clostridium thermocellum*, Cel9I and Cel48Y, hydrolyse crystalline cellulose synergistically. *FEMS Microbiol Lett* 268:194–201.
- ) Botton B., Breton A., Fèvre M., Gauthier S., Guy P., Larpent J.P., Reymond P., Sanglier J.J., Vayssier Y., Veau P., 1990. Moisissures utiles et nuisibles, Importance industrielle, Ed. Masson, Paris
- ) Botton B., Breton A., Fevre M., Gauthier S., Guy ph., Larpent J P., Reymond P., Nevalainen k M H., Palva E J. 1990. Production of extracellular enzymes in mutant Isolated from *Trichoderma viridea* unable to hydrolyse cellulose. *Appl envirmicrobiol*, 33, P: 11-16.
- ) Bornscheuer T. 2002. Microbial carboxylesterases. classification, properties, and application in biocatalysis. *FEMS Microbiology Reviews*, P: 73-81.
- ) Chabasse D., Bouchara J-P ; De gentile L., Brun S., Cimmon B., Penn P. 2002. Cahier de formation les moisissures d'intérêt médicale.
- ) Cordova Lopez, J. A. 1998. Isolement, identification et physiologie des champignons thermophiles en vue de la production de lipases par fermentation en milieu solide.

- ) Dix NJ & Webster J. 1995b. Fungi of Extreme Environments. En 'Fungal Ecology'. Chapman & Hall. London. 322-332.
- ) 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.
- ) Dvail, S., Grety, J. et Lenzi, M. 2010. Les actinomycètes, source de biomolécules d'intérêt industriel. Haute école de la province de liège.
- ) Ertan, F. et Balkan B. 2007. Production of  $\alpha$ -Amylase from *Penicillium chrysogenum* under Solid-State Fermentation by Using Some Agricultural By-Products. Food Technol. Biotechnol. 45 (4).
- ) Fischer, L., Scheckermann, C. Wagner, F. 1995. Purification and characterization of a thermotolerant beta-galactosidase from *Thermomyces lanuginosus*. Appt. Environ. Microbiol. 61: (4) 1497-1501.
- ) Fujita Y., Takashashi S., Ueda M., Tanaka A., Okada H., Morikawa Y., Kawaguchi T.,rai M., Fukuda H., Kondo A. 2002. Direct and efficient production of ethanol from cellulosic material with a yeast strain displaying cellulolytic enzymes. Appl. Environ. Microbiol. 68 (10): p: 5136-5141.
- ) Jaouadi B, Abdelmalek B, Fodil D, Ferradji FZ, Rekik H, et Zarai N. 2010. Purification et caractérisation d'une kératinase thermostable KERAK-29 chez une nouvelle souche d'Actinomycète. Thèse de doctorat : Biochimie Appliquée. Annaba : Université Badji Mokhtar Annaba. 413p.
- ) Jay, J.M. 1996. High-Temperature Food Preservation and Characteristics of Thermophilic Microorganisms. En 'Modern food microbiology'. Chapman & Hall. New York. 347-370.
- ) Joo HS and Chang CS .2005. Oxidant and SDS stable alkaline protease from a halotolerant *Bacillus clausii* I-52: enhanced production and simple purification. J. Appl. Microbiol. 98(2), 491–497.
- ) Juhasz T, Szengyel Z, Reczey K, Siika-Aho M and Viikari L. 2005. Characterization of cellulases and hemicellulases produced by *Trichoderma reesei* on various carbon sources. Process Biochem., 40: 3519-3525.
- ) Hibbett, D.S., Binder, M., Bischoff, J.F., Blackwell, M., Cannon, P.F., Eriksson, O.E., Huhndorf, S., James, T., Kirk, P.M., Lücking, R., Thorsten Lumbsch, H., Lutzoni, F., Matheny, P.B., McLaughlin, D.J., Powell, M.J., Redhead, S., Schoch,

- C.L., Spatafora, J.W., Stalpers, J.A., Vilgalys, R., Aime, M.C., Aptroot, A., Bauer, R., Begerow, D., Benny, G.L., Castlebury, L.A., Crous, P.W., Dai, Y.C., Gams, W., Geiser, D.M., Griffith, G.W., Gueidan, C., Hawksworth, D.L., Hestmark, G., Hosaka, K., Humber, R.A., Hyde, K.D., Ironside, J.E., Koljalg, U., Kurtzman, C.P., Larsson, K.H., Lichtwardt, R., Longcore, J., Miadlikowska, J., Miller, A., Moncalvo, J.M., Mozley-Standridge, S., Oberwinkler, F., Parmasto, E., Reeb, V., Rogers, J.D., Roux, C., Ryvarden, L., Sampaio, J.P., Schussler, A., Sugiyama, J., Thorn, R.G., Tibell, L., Untereiner, W.A., Walker, C., Wang, Z., Weir, A., Weiss, M., White, M.M., Winka, K., Yao, Y.J., Zhang, N. 2007. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycol Res* 111, 509-547.
- J) Hoondal G, Tiwari R, Dahiya N and Beg Q .2002. Microbial alkaline pectinases and their industrial applications: a review. *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 59, no. 4-5, pp. 409–418.
- J) Gao XG, Cao SG and Zhang K .2000. Production, properties and application to nonaqueous enzymatic catalysis of lipase from a newly isolated *Pseudomonas* strain. *Enzym. Microb. Technol.* 27, 74–82.
- J) García-Gómez M. J., Huerta-Ochoa S., Loera-Corral O., Prado-Barragán L. A. 2009. Advantages of a proteolytic extract by *Aspergillus oryzae* from fish flour over a commercial proteolytic preparation. *Food Chem.* 112. 604–608.
- J) Gassara, F. 2012. Production économique d'enzymes ligninolytiques par fermentation à l'état solide des déchets agroindustriels et leurs applications (Doctoral dissertation, Université du Québec, Institut national de la recherche scientifique).
- J) Gregoire P., Fardeau ML., Guaso S., Bouanane A., Michotey V., Bonin P., Dubourg K., Cambar J., Ollivier B.2009. Les micro-organismes de l'extrême. *Press therm climat.* 146 : 49-61
- J) Kathiresan, K., & Manivannan, S. 2006. -Amylase production by *Penicillium fellutanum* isolated from mangrove rhizosphere soil. *African journal of Biotechnology*, 5(10).
- J) Kikani BA and Singh SP .2011. Single step purification and characterization of a thermostable and calcium independent  $\alpha$ -amylase from *Bacillus amyloliquifaciens* TSWK1-1 isolated fromTulsi Shyamhot spring reservoir, Gujarat (India). *International Journal of Biological Macromolecules*,vol.48 , no.4,pp. 676-681.

- J Kitamoto N., Go M., Shibayama T., Kito Y., Ohmiya K., Tsukagoshi N., 1996. Molecular cloning, purification and characterisation of two endo-1,4- $\alpha$ -glucanases from *Aspergillus oryzae* KBN 616. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 46:p: 538-544.
- J Kubicek C. P., and Penttila M. E. 1998. Regulation of production of plant polysaccharide degrading enzymes by *Trichoderma*. In G. E. Harman and C. P. Kubicek (2 ed), p: 49-72. Taylor & Francis Ltd., London, United Kingdom.
- J Kuhad RC, Gupta R and Singh A .2011. Microbial cellulases and their industrial applications. *Enzyme Research* .Volume 2011. 10 pages.
- J Lokington R.A., Kelly J.M. 1997. Direct conversion of cellulose to ethanol by engineered filamentous fungi. *Environmental Biotechnology*. 7 (6).p : 363-368.
- J Madigan T. M. et Martinko M. J. 2007. *Brock biologie des micro-organismes*. Pearson. France. 1047 p.
- J Meyer A., Deiana J., Bernard A. 2004. *Cours de microbiologie générale : avec problèmes et exercices corrigés*. 2<sup>ème</sup> édition, Doin, France, p. 430.
- J Meyer A., Deiana J. et Bernard A. 2008. *Cours de microbiologie générale*. Doin. France. 5470 p.
- J 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.
- J Miyamoto K, Tsujibo H, Nukui E, Itoh H, Kaidzu Y and Inamori Y .2002. Isolation and characterization of the genes encoding two metallo proteases (MprI and Mpr II) from a marine bacterium, *Alteromonas sp.* strain O-7. *Biosci Biotechnol Biochem* 66:416–421.
- J Nabors, M. 2008. *Biologie végétale*. Paris: Pearson Education, 614p.
- J Najafi MF, Deobagkar D and Deobagkar D .2005. Potential application of protease isolated from *Pseudomonas aeruginosa* PD100. *Electronic J. Biotechnol.* 8, 197–203.
- J Nathalie Meunier. 1999. Évaluation du potentiel de production de protéases bactériennes à partir de boues d'épuration municipales.
- J Ole, K., T.V. Borchert and C.C. Fuglsang. 2002. Industrial enzymes applications. *Current opinion in Biotechnology*. 13:345-351.

- J Petterson G., Farger S.L., Bhikhabhai R., Leandroer K. 1981. In the Ekman-Days. International Symposium on wood and pulping Chemistry, SCPI, Stockholm, 111.p: 39.
- J Pitt J. I. Hocking A. D. 2009. Fungi and food spoilage. Springer. New York.
- J Poortmans J. R. et Boisseau N. (2004). Biochimie des activités physiques. De Boeck. Paris. P. 36-262.
- J Poortmans, Jacques R. et Boisseau, Nathalie. 2003. *Biochimie des activités physiques*. De Boeck Supérieur.
- J Prazeres JND, Cruz JAB and Pastore GM .2006. Characterization of alkaline lipase from *Fusarium oxysporum* and the effect of different surfactants and detergents on the enzyme activity. Braz. J. Microbiol ; 37:505-509.
- J Prenosil, J.E., Dunn, I.J. & Heinzle, E. 1987. Biocatalyst Reaction Engineering. En 'Biotechnology'. Ed. J.F. KENNEDY. Vol. 7a 'Enzyme Technology'. VCH. New York. 490-545.
- J Punt J. P., Biezen V. N., Canesa A., Albers A., Mangnus J. et Hondel D. V. C. 2002. Filamentous fungi as cell factories for heterologous protein production. TRENDS in biotechnology. 20 (5) : 200-206.
- J Riou C., Salmon J.M., Vallier M.J., Gunata Z., Barre P. 1998. Purification, characterisation, and substrate specificity of a novel high glucose tolerant - glucosidases from *Aspergillus oryzae*. Appl. Microbiol. Biotrechnol. 64.p: 3607-3614.
- J Roquebert M.F. 1998. Taxonomie des moisissures ; Méthodes de culture et techniques d'observation ; Identification", in "Moisissures des aliments peu hydratés", Ed. Tec & Doc, P: 39-95
- J Sharma, R., y'Chisti and U. C. Banerjee. 2001. Production, purification, characterization, and applications of lipases. Biotechnology Advances, 19 :627-662.
- J Smith N. R., Gordon R. E. & Clark F.E. 1952. Aerobic spores-forming bacteria. J. Appl. Bact. 27: 78-99. In thèse de doctorat : Dendouga Wassila (2006) Isolement et identification de moisissures productrices de protéases à partir de milieux extrêmes.
- J Sohail, M, Siddiqi R, Ahmad A and Khan SA .2009. Cellulase production from *Aspergillus niger* MS82 : Effect of temperature and pH. New Biotechnol., 25: 437-441

- J Tatsinkou F.B., Taveai F. et Ndjouenkeui R., 2005. Production and partial characterization of a thermostable amylase from ascomycetes yeast strain isolated from starchy soils. *African Journal of biotechnology.*, 4 (1), pp.14-18
- J Wu T. Y., Mohammad A. W., JahimJ.Md.,Anuar N. 2006. Investigations on protease production by a wild-type *Aspergillus terreus* strain using diluted retentate of pre-filtered palm oil mill effluent (POME) as substrate. *Enzyme Microb. Technol.* 39: 1223–1229.
- J Site web1: <http://www.cprac.org/docs/BiotecnologiaFRA.pdf>
- J Site web 2 :Vague, L. Associates of Cape Cod, Int'l. *ASSOCIATES*,44(151.547).

## Annexes

### Annexe 1 : Milieux de repiquage et de conservation des souches

#### 1.1. Milieu Potato-Dextrose-Agar (P.D.A)

Agar-agar 20 g

Pomme de terre 200 g

Dextrose 20 g

Eau distillée 1000 ml

Laver, couper en morceaux les pommes de terre, les faire cuire, filtrer, ajouter l'agar, le glucose puis ajuster la quantité d'eau. Autoclaver 20 minutes à 120 °C.

#### 1.2. Milieu Sabouraud

Glucose 20g

Peptone 10g

Agar 15g

Eau distillé 1000 ml

pH = 5.6

stérilisation à 120°C pendant 20 minutes

#### 1.3. Czapek Yeast Extract Agar (CYA)

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1g

Czapek concentré 10ml

Solution métallique 1ml

Extrait de levures, en poudre 5g

Saccharose 30g

Agar 15g

Eau distillée 1 litre

Stériliser à l'autoclave à 121°C pour 15 min, le pH final est 6,7.

### **1.3.1. Czapek concentré**

NaNO<sub>3</sub> 30g

KCl 5 g

MgSO<sub>4</sub>- 7H<sub>2</sub>O 5 g

FeSO<sub>4</sub>- 7H<sub>2</sub>O 0,1 g

Eau distillée (qsp.) 100 ml

### **1.3.2. Solution de métallique**

CuSO<sub>4</sub>- 5H<sub>2</sub>O 0,5 g

ZnSO<sub>4</sub>- 7H<sub>2</sub>O 1 g

Eau, distillée 100 ml

Maintenir indéfiniment sans stérilisation.

### **1.4. Malt Extract Agar (MEA)**

- Extrait de Malt 20 g

- Peptone 1 g

- Glucose 20 g

- Agar 20 g

- Eau distillée qsp 1000 ml

Autoclavage à 120 °C pendant 15 min.

### **1.5. Eau Physiologique**

Chlorure de sodium 9 g

Eau distillée 1000 ml

**Annexe 2 : Milieux de la mise en évidence des activités enzymatiques**

**2.1. Lait gélosés**

Lait écrèmes 100g

Agar 20g

Eau distillé 1000 ml

**2.2. Milieu de culture à base de gélatine 5%**

Gélatine 50g

Agar 20g

Eau distillé 1000 ml

**2.3. Milieu de culture à base de cellulose 3%**

Cellulose 3g

Agar 20g

Eau distillé 1000 ml

**2.4. Milieu de culture à base de lactose 5%**

Lactose 1g

Agar 20g

Eau distillé 1000 ml

**2.5. Milieu de culture à base d'amidon 1%**

Amidon 1g

Agar 20g

Eau distillé 1000 ml

### **Annexe 3: Les indicateurs colorés**

#### **3.1. Rouge Congo à 0.1%**

Rouge Congo 0.1g

Eau distillé 100 ml

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

#### **3.2. Eau iodée (Lugol)**

Iode 1g

Iodure de potassium 2g

Eau distillé 100 ml

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

#### **3.3. lactophénol (Guiraud, 1998)**

Acide lactique 100 ml

Phénol 100 g

Glycérol 100 ml

Eau distillée 100 ml

تتمثل أهداف عملنا في تحديد وعرض النشاط التحليلي للإنزيمات الخارج الخلوية لسلاسل عفن عزلت من بيئة قاسية ( )  
بعد زرع العينات على وسط PDA 9 سلالات مختلفة من الفطريات الخيطية مقسمة إلى 4

*Aspergillus, Penicillium, Trichophyton, >Bipolaris.*

وأظهرت السلالات التي تم اختبارها أربعة أنشطة إنزيمية من بين الخمسة ، وأبرزها نشاط الجيلاتين والأميلاز مع 9 ( 100 )  
ونشاط كبير من السليلاز ( 89 ) 8 . وكذا أظهرت هذه السلالات نشاط كبير في تحليل البروتينات 56 .

كلمات مفتاحية : , نشاط تحليلي , إنزيم خارج خلوي

### Résumé

Les objectifs de notre travail sont d'identifier et de mettre en évidence l'activité des enzymes hydrolases extracellulaires de moisissures isolés du milieu extrême (source thermale). Les cultures des prélèvements sur milieu PDA ont permis d'isoler neuf souches différentes de champignons filamenteux sont réparties sur 4 genres différents: *Aspergillus, Penicillium, Trichophyton, Bipolaris*. Les souches testées ont présenté quatre activités sur les 5 recherchées dont la plus remarquable est l'activité protéolytique et amylolytique avec les 9 souches (100%) produisant des gélatinases et des amylases et une activité important de cellulase (89%) avec 8 souches. Ainsi ces moisissures ont présenté une activité protéolytique considérable 56% produisant des caséinases.

**Mots clés :** moisissures, source thermale, activité hydrolase, enzyme extracellulaire.

### Abstract

The objectives of our work are to identify and highlight the activity of extracellular hydrolase enzymes from mold isolated from the extreme middle (thermal source). The cultures of the samples on PDA medium are permitting to isolate nine different strains of filamentous fungi are divided into 4 different genera: *Aspergillus, Penicillium, Trichophyton, and Bipolaris*. The strains tested presented four activities on the 5 sought ones, the most remarkable being the proteolytic and amylolytic activity with the 9 strains (100%) producing gelatinases and amylases and a significant activity of cellulase (89%) with 8 strains. Thus these molds showed a considerable proteolytic activity 56% producing caseinases.

**Keywords:** mold, thermal source, hydrolase activity, extracellular enzyme.