

Mag/574.88 - 217/02

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

REPUBLICUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE
ET POPULAIRE

UNIVERSITE ABOU-BEKR BELKAID
TLEMCEN

INSTITUT DES SCIENCES DE LA NATURE
THESE DE MAGISTER EN BIOLOGIE
Option : Biologie Moléculaire et Cellulaire
THEME

Contribution à l'étude de la flore fongique
du lac d'El Goléa : taxonomie, écologie
et production de métabolites

Présentée par : **Mr BOUTAIBA Saad**

Soutenu le : Octobre 1997
devant la commission d'Examen

Mr BENYOUCEF
Mr HACENE
Mr BENSOLTANE
Mr KIHHEL
Mr ABDELWAHED

Docent
Maître de conférences
Maître de conférences
Maître de conférences
Maître Assistant

Président du jury
Promoteur
Examineur
Examineur
Examineur

Université de Tlemcen
USTHB
Université d'Oran
Université d'Oran
Université de Tlemcen

REMERCIEMENTS

- A Monsieur HACENE HOCINE dont, les conseils prodigués et la celerité avec laquelle il a dirigé mon travail font de lui le véritable porteur d'eau de ce mémoire. En puisant dans le registre linguistique je ne pourrais trouver le terme exact pour le remercier, puisse t-il trouver dans ces lignes ma vive gratitude.
- A Monsieur BENYOUCEF Président du jury, que je remercie d'avoir accueilli favorablement ma demande de présider le jury, un geste qui l'honore et qui me fait honneur.
- Je n'oublierais pas de remercier vivement Monsieur BENSOLTANE Maître de conférence à l'université d'Oran ainsi que Monsieur KIHHEL Maître de conférence à l'université d'Oran et enfin Monsieur ABDELOUHAD CHARGE de cours à l'université de Tlemcen d'avoir accepté de juger mon travail qu'ils trouvent dans ces lignes ma vive gratitude.
- Je tiens à remercier également Mr MOUSSAOUI Abdellah pour l'aide qu'il m'a prodigué pour l'identification des touches, qu'il trouve ici ma reconnaissance.

SOMMAIRE

INTRODUCTION GENERALE	01
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	
I - Généralités sur les champignons	03
1.1- Organisation fongique	03
1.2- Classification et caractères des principaux groupes de champignons	04
1.3- Hyphomycetes aquatiques	06
II - Les organismes extrémophiles	07
2.1- Définition des environnements extrêmes	07
2.2- Ecologie et habitats des extrémophiles	07
2.2.1- Environnements thermobiotiques	07
2.2.2- Sols alcalins et sources carbonatées	07
2.2.3- Lac du Soda	08
2.2.4- Lacs hypersalés	08
2.3- Les champignons dans les environnements extrêmes	10
2.3.1- Champignons thermophiles	10
2.3.1.1- Bases de la thermophile	10
2.3.1.2- Variétés et distribution des champignons thermophiles	10
2.3.2- Champignons Xérophiles	11
2.3.3- Champignons Halophiles	11
2.3.4- Bases de la Xérophilie	11
III - Rôle des micro-organismes extrémophiles en biotechnologie	14
3.1- Industrie enzymatique	14
3.1.1- Hydrolases de l'amidon	14
3.1.1.1- α -amylase	14
3.1.1.2- Glucoamylase ou amyloglycosidase	15
3.1.2- Enzymes protéolytiques	15
3.2- Industrie pharmaceutique	15
IV - Importance écologique des champignons	17
4.1- Dégradation du 2,4.-Dichlorophynoxy acétique acide	17
4.2- Biodégradation des hydrocarbures aromatiques	17

PREMIERE PARTIE

Mycoflore extrémophile du lac d'El Goléa Systématique et distribution

I- Présentation du milieu	21
1.1- Climat	21
1.2- Description du Lac	21
II- Matériels et méthodes	24
2.1- Prélèvements	24
2.2- Analyses des échantillons au laboratoire	24
2.2.1- Analyses physico - chimiques	24
2.2.1.1- Paramètres physico - chimiques	24
2.2.1.2- Paramètres de pollutions organiques	24
* 2.2.1.3- Dosage des sels ou minéralisation globale	24
2.3- Analyses microbiologiques	24
* 2.3.1- Préparation des milieux de culture	24
2.3.2- Inoculation	25
2.3.3- Repiquage et isolement des souches	25
2.3.4- Conservation des souches	25
2.3.5- Identification des souches	25
2.4- Détermination des optimums de température et de salinité	26
2.5- Distribution de la mycoflore du lac sur les quatre stations	26
III- Résultats et discussion	27
3.1- Paramètres organoleptiques de l'eau	27
3.2- Analyses physico-chimiques	27
3.2.1- Paramètres physico-chimiques	27
3.2.2- Paramètres de pollution minérale	27
3.2.3- Minéralisation globale	28
3.3- Analyse microbiologique	33
3.3.1- Dénombrement de la flore fongique	33
3.3.1.1- Prélèvement effectué en Janvier	33
3.3.1.2- Prélèvement de l'eau effectué en Juin	33
3.3.1.3- Prélèvement de l'eau effectué en Octobre	33
3.3.2- Isolement de souches	33
3.3.3- Identification des souches	35
3.3.3.1- Détermination de la classe	35
3.3.3.2- Détermination des genres des classes de Deutéromycètes et de Zygomycètes	35
3.3.3.3- Détermination de l'espèce du genre <i>Aspergillus</i>	36
3.3.3.4- Détermination de l'espèce du genre <i>Penicillium</i>	36
3.3.3.5- Détermination de l'espèce du genre <i>Fusarium</i>	37

3.4- Détermination de l'optimum de croissance des souches	37
3.4.1- Détermination de l'optimum de température de croissance	37
3.4.2- Détermination de l'optimum de salinité pour la croissance des souches	37
3.5-Distribution de la mycoflore du lac sur les quatre stations	50
CONCLUSION	52

TROISIEME PARTIE Production, Extraction, Purification et Essai de caractérisation des molécules d'antibiotiques et d'enzymes

INTRODUCTION	53
I- Matériel et méthodes	53
1- Aptitude des souches extrémophiles à produire des antibiotiques ou des enzymes	53
1.1- Mise en évidence de l'activité antibiotique	53
1.1.1- Milieux de culture utilisés	53
1.1.2- Tests d'antibiose	53
1.2- Mise en évidence de l'activité enzymatique	54
1.3- Biodégradation	55
1.3.1- Biodégradation du 2.4 - D	55
1.3.2- biodégradation du Benzène	55
2- Etude préliminaire des activités antibiotique, enzymatique et de la biodégradation des souches extrémophiles	55
2.1- Production d'antibiotique par la souche SM2	55
2.1.1- Souche productrice	55
2.1.2- Micro - organismes cible	55
2.1.3- Production d'antibiotiques en milieu liquide	56
1) <i>Mesure de la croissance</i>	56
2) <i>Mesure de la production d'antibiotique</i>	56
2.1.4- Extraction de l'antibiotique	56
2.1.5- Purification de l'antibiotique	58
2.1.5.1- Chromatographie sur couche mince	58
a) <i>Chromatographie analytique</i>	58
b) <i>Révélation microbiologique des chromatogramme</i>	58
c) <i>Chromatographie préparative sur couche mince</i>	58
2.1.6- Essai de caractérisation de l'activité antibiotique élaborée par la souche SM2	59
2.1.6.1- Solubilité	59
2.1.6.2- Révélation chimique (réaction chromogénique)	59
1) <i>Révélation des acides aminés</i>	59
2) <i>Révélation des sucres</i>	59

3) <i>Révélation des lipides</i>	59
2.1.6.3- Étude de la stabilité du produit actif élaboré par la souche SM2	61
1) <i>stabilité selon la température</i>	61
2) <i>Stabilité en fonction du pH</i>	61
3) <i>Stabilité au cours de la conservation</i>	61
2.2- Production de l' α -amylase en milieu liquide	61
2.2.1- Effet du NaCl sur la production de l' α -amylase	61
2.2.2- Méthodes d'analyse	61
2.2.2.1- Dosage des protéines totales par la méthode de LOWRY	61
2.2.2.2- Mesure de l'activité α -amylasique	62
2.2.2.3- Purification de l'-amylase	63
2.3- biodégradation du 2,4-D	63
2.4- Biodégradation du Benzène	63
II- Résultats et discussion	64
1- Evaluation de l'aptitude des souches pour la production d'antibiotique et d'enzymes	64
1.2- Détermination de l'activité antibiotique de la souche SM ₂	64
1.3- Cinétique de croissance et de production de l'antibiotique	64
1.4- Extraction des substances actives	68
1.5- Purification de l'antibiotique	68
1.5.1- Choix du système de solvant	68
1.5.2- Analyse des chromatogrammes	68
1.6- Essai de caractérisation	68
1.6.1- Solubilité	68
1.6.2- Révélation chimique	68
1.7- Thermostabilité	69
1.8- Recherche de l'activité amylolytique	70
1.8.1- Effet du NaCl sur la production de l' α -amylase	70
1.8.2- Evaluation de l'activité α amylasique	70
1.9- Purification de l' α -amylase par précipitation à l'éthanol	70
1.10- Dégradation de 2,4-D	72
1.11- Dégradation du benzène	72

CONCLUSION

75

CONCLUSION GENERALE

76

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ANNEXES

ABBREVIATIONS

C.S.L	: Corn-Steep liquor
G	: Glucose
SG	: Sirop de glucose
MS	: Matière sèche
C	: Carbone
N	: Azote
P.D.A	: Potatoes d'extrose Agar
P.T.A	: Plate test Agar
C.D.A	: Czabeks dox agar
A.w	: Water Activity
%	: Pourcentage
P.P.m	: Partie par million
C.Y.A	: Czapek Yest Agar
G25N	: 25% Glycerol Nitrate Agar
M.E.A	: Malt extract Agar
D.O	: Densité optique
D.E	: Dextrose equivalent
nm	: Nanomètre
2,4-D	: 2,4 - Dichlorophynoxy Acetic acid
[S.B.A]	: Solution albumine bovine
A*	: Activité
Rf	: Rapport frontale
Fs	: Front du solvant

INTRODUCTION GENERALE :

Les milieux aquatiques des chotts et des sebkhas, constituent des écosystèmes extrêmes en raison de leur situation géographique et de leur salinité. Ils renferment une microflore extrémophile très particulière (Halophile et thermophile).

Ces micro-organismes extrémophiles constituent un outil performant pour les sciences fondamentales du fait qu'ils représentent le modèle unique de la stabilité des biomolécules aux conditions extrêmes de l'environnement. Les recherches dans ce domaine ont permis l'exploration des frontières les plus éloignées de la vie tout en donnant une autre dimension à la biodiversité du monde microbien (AGUILAR, 1995).

L'utilisation de ce type de micro-organismes en bio-industrie a ouvert la voie vers une biotechnologie future de molécules hautement stables aux conditions extrêmes de pH, de température et de salinité.

L'union européenne en 1982 et dans son programme de recherche en biotechnologie, donna la priorité aux projets d'exploitation des extrémophiles en bio-industrie (AGUILAR et al, 1989). Depuis plus de 39 organismes de recherche et partenaires industriels se sont mis en étroite collaboration pour la recherche et l'exploitation des extrémophiles bénéficiant d'une enveloppe financière de 4,5 millions d'ECU (Européen Currency Unit) (AGUILAR, 1996).

La description des biotopes extrêmes et l'étude des organismes extrémophiles ont fait l'objet de nombreux travaux. Les plus importants sont ceux de GRANT et ROSS, (1986) ; TINDALL et al (1980) et KRISTJANSSON et HREGGVIDSSON, (1995) qui ont étudié l'écologie de ces écosystèmes et les organismes extrémophiles autochtones.

La majorité de ces travaux ont concerné essentiellement les bactéries et les levures cependant les champignons filamenteux ont été peu étudiés. Les plus importants travaux dans ce domaine sont ceux de MOUBACHER et al (1991) ; PITT (1988) et MOUTAWAKIL et al (1993) qui ont isolé des champignons halophiles et alcalophiles.

Cet intérêt accordé particulièrement aux extrémophiles par la communauté scientifique nous a incité à nous intéresser à ces micro-organismes extrémophiles et en particulier les champignons dont l'intérêt écologique et industriel semble être peu étudié.

Notre présent travail constitue une contribution à l'étude de la flore fongique d'un biotope extrême: le Lac d'El Goléa qui se caractérise par son situation géographique, son climat, sa forte salinité et surtout sa pollution (HACENE, 1995). Il s'inscrit dans le cadre d'un programme de recherche visant l'exploitation des écosystèmes sahariens à l'Unité de Recherche sur les Zones Arides (URZA). Ce travail se fait en parallèle à d'autres portant sur d'autres types d'organismes (bactéries, algues et actinomycètes). L'étude des organismes extrémophiles au niveau de notre laboratoire a déjà permis d'isoler de nouvelles souches et produits (HACENE, 1993 ; HACENE et al, 1994 ; HACENE et LEFEBVRE, 1995 ; HACENE et LEFEBVRE, 1996 ; HACENE et al, 1997)

Dans cette optique notre travail a été scindé en trois parties:

La première partie en style introductif, résume les principaux caractères morphologiques et culturels des champignons, une description des biotopes extrêmes et les organismes extrémophiles présents et enfin l'intérêt écologique et industriel de ces micro-organismes en particulier les champignons.

La deuxième partie traite l'isolement et l'identification de la mycoflore du lac, les degrés de l'halotolérance et thermotolérance et enfin la distribution de cette mycoflore sur les différentes stations du lac.

La troisième partie porte essentiellement sur l'intérêt écologique et industriel des souches extrémophiles. Pour se faire, nous avons effectué une évaluation de l'aptitude de ces souches dans la production d'enzymes, d'antibiotiques et dans la biodégradation des composés aromatiques. Les souches performantes sont sélectionnées pour la production des molécules d'antibiotiques et d'enzymes. Des essais d'extraction et de purification de ces molécules ont été effectués dans le but de les caractériser.

I - Généralités sur les champignons :

Les champignons sont des organismes eucaryotes qui appartiennent au règne des fungi ou mycètes. La paroi cellulaire responsable de la forme est riche en cellulose ou en chitine selon les groupes (cellulose chez les *Myxomycètes*, *Saprolegniales* et *Perenosporales*, chitine chez les *Mucorales*, *Ascomycètes* et *Basidiomycetes*). Elle contient également en proportion variable des substances mucilagineuses, des polysaccharides, des substances pectiques, des protéines et de l'hemicellulose. Le cytoplasme limité par une membrane cytoplasmique contient des ribosomes, des mitochondries, un ergacytoplasme, des vacuoles et un ou plusieurs noyaux. Les réserves sont sous forme de tréhalose et de glycogène. Il existe également des inclusions lipidiques.

Les noyaux sont de petite taille ; ils sont limités par une membrane nucléaire et contiennent plusieurs chromosomes.

1-1 Organisation fongique : figure 1'

Un champignon filamenteux est composé par un thalle de structure coenocytique. Une partie végétative assure le développement en puisant dans le milieu les éléments nécessaires à la vie du champignon. Les structures fructifères et reproductrices servent à la multiplication et à la dissémination de l'espèce : ces structures sont d'origine végétative ou d'origine sexuelle.

• Le thalle végétatif :

Chez les myxomycètes l'organe végétatif est une plasmode (masse cytoplasmique contenant plusieurs noyaux). Les autres groupes de champignons présentent un thalle mycélien (exception faite des levures qui ont une forme unicellulaire) : Le mycélium est formé de tubes plus ou moins ramifiés (hyphes). Il est soit continu (phycomycètes), soit cloisonné (Septomycètes). Dans ce dernier cas les séparations cellulaires ou septa sont percés de plasmodesmes. Le pseudomycélium qui est rencontré dans certains cas est formé de cellules restant accolées après des divisions successives par bourgeonnement.

On rencontre chez certaines moisissures des formations mycéliennes particulières telles les stolons (organe de fixation) chez certains Mucorales.

Le thalle mycélien peut aussi se transformer en formations particulières massives appelées Stromas. Certaines stromas ont un rôle de conservation (Sclérotés) ; d'autres servent de support et de protection aux organes de reproduction végétatives ou sexuelles (apothécies et perithèces des ascomycètes, Stroma des Basidiomycètes, sporodochium, acervules, pycnides des deuteromycètes).

• Les organes de reproduction et de dissémination :

La reproduction et la dissémination des champignons filamenteux s'effectuent grâce à la formation de cellules particulières que l'on appelle de façon générale spores.

Les spores peuvent avoir deux origines

1- Origine sexuelle : Ces spores résultent d'une méiose : ce sont les formes « parfaites »

2- Origine végétative : Ces spores résultent d'une simple mitose : ce sont les formes « imparfaites ». Elles assurent la reproduction et la dissémination de l'espèce chez les Deutéromycètes (qui ne possèdent pas de formes « parfaites ») mais on les trouve également chez les autres groupes ou elles coexistent à côté des formes « parfaites ». On les appelle fréquemment « conidies ». On distingue plusieurs formes « imparfaites » :

- Les thallospores sont formées au dépend du thalle. Il ya plusieurs types de thallospores
 - arthrospores (fragmentation du mycélium)
 - blastospores(bourgeonnement)
 - chlamydospores(spores volumineuses terminale ou intracellulaire à paroi épaisse)
 - Les sporangiospores : on les rencontre chez les phycomycètes. Elles sont contenues dans un sporange porté généralement par un filament appelé le sporangiophore
 - Les conidiospores : Ce sont des spores exogènes toujours terminales qui naissent un filament appelé conidiophore ou de structure issue du conidiophore appelés phialides.

1.2 - Classification et caractères des principaux groupes de champignons :

Ces organismes de formes et de structures diverses ont fait l'objet de nombreuses classifications basées essentiellement sur les caractères morphologiques et cultureux (ALEXOPOULOS et MIMS, 1979 et DEACON, 1980). Dans ce qui suit nous exposerons succinctement les grands groupes de champignons selon la classification de BOTTON et al, (1990).

1.2.1. Division I : *Gymnomycota* :

Elle regroupe les champignons dont l'appareil végétatif est dépourvu de paroi ;présence de myxamides et de plasmodes. Exemple : *Plasmodiophora brassicae* provoquant la hernie du chou.

1.2.2. Division II : *Mastigomycota* :

Elle comprend les champignons caractérisés par une reproduction asexuée typiquement par spores mobiles (zoospores). Exemple : les **Phycomycètes**.

1.2.3. Division III : *Amastigomycota* :

Caractérisée par l'absence de cellules mobiles, cette division est subdivisée en 4 classes :

1.2.3.1. Classe des *Zygomycètes* :

Présente un mycélium non cloisonné, et la reproduction asexuée le plus souvent se fait par Sporocystospores ; c'est le cas des Zygomycètes, exemple : *Mucor mucedo* ou par conidies exogènes et la reproduction sexuée, se fait par fusion de gamétocystes, c'est le cas des Trichomycètes.

1.2.3.2. Classe des *Ascomycètes* :

Se caractérise par un thalle à mycélium septé ou unicellulaire (levures). Exemple : *Saccharomyces cerevisiae*.

La reproduction sexuée se fait par formation de spores méiotiques (ascospores), dans des asques, la reproduction asexuée se fait par des conidies. Exemple : *Aleuria*.

1.2.3.3. Classe des *Basidiomycètes* :

Présente un thalle à mycélium septé, ou unicellulaire (levure). La reproduction sexuée se fait par la formation de spores méiotiques (Basidiospores) sur les basides. Ils sont dit Basidiomycètes Exemple : *Puccinia* , *Agaricus*

1. 2. 3. 4. Classe des Deutéromycètes :

Présentent un thalle à mycélium septé, ou unicellulaire (levures), absence de reproduction sexuée connue, reproduction asexuée se fait par des conidies parfois absente (mycélium stérile) ce sont les deutéromycètes ou champignons imparfaits. Exemple les genres: *Aspergillus et Penicillium*.

Pour des raisons de commodité, nous ne détaillerons que les principales classes : des zygomycètes et des Deutéromycètes (division III : *Amastigomycota*).

La classe des Zygomycètes se compose de 2 ordres : l'ordre des Entomophtorales et l'ordre des Mucorales. Ce dernier est représenté par des champignons filamenteux, à mycélium souvent envahissant, non septé (siphonné), ou à cloisons formées exceptionnellement au niveau des organes reproducteurs, ou lors de la différenciation des spores de résistance (chlamydospores).

Les spores asexuée sont formées dans des sporocystes.

- La classe des Deuteromycetes comprend tous les champignons qui ne produisent ni ascospores, ni basidiospores, et produisent un thalle à mycélium septé ou uni cellulaire et se multiplient au moyen des conidies. Les Deutéromycètes se composent de trois groupes : Blastomycètes, Coelomycètes et Hyphomycètes. Cette dernière est représentée par des champignons filamenteux stériles, ou produisant leurs spores directement sur les hyphes ou sur des conidiophores simples ou agrégés.

Cependant et devant la pléomorphie des champignons, les critères morphologiques sont relativement peu nombreux et dans la plupart des cas ne suffisent pas pour permettre une identification sans ambiguïté. Pour cela d'autres techniques complémentaires ont été proposées. Il s'agit essentiellement de l'hybridation DNA-DNA (KURTZMAN, 1984) et l'identification biochimique basée sur des tests enzymatiques à l'aide de galeries APIZYM. En effet CARLOTTI et al (1992) et BRIDGE et HAWKSWORTH (1984) utilisèrent la méthode APIZYM comme complément à l'identification des espèces de *Cladosporium et Penicillium*.

1. 3 - Les hyphomycètes aquatiques :

Depuis une vingtaine d'années, de nombreux travaux ont été consacrés à la biologie et à l'écologie des hyphomycètes aquatiques. Ce sont des champignons imparfaits des Ascomycètes ou des Basidiomycètes à sporulation aquatique ou non aquatique. On dénombre près de 300 espèces dans le monde.

En Afrique et particulièrement au Maghreb, très peu de travaux leur ont été consacrés. BERNARD, (1983) isola cinq espèces de *Pythium* à partir de l'oued GUIR près de Bechar et en 1984 le même auteur a réussi à isoler pour la première fois en Algérie, *Achlya radiosa Maurizio* à partir des eaux que drainent les montagnes de Djurdjura en Kabylie et Oued Mina près de Tiaret. De leur côté CHERGUI et PATTEE, (1991) et CHERGUI (1992) étudièrent la densité et la distribution de la mycoflore aquatique de l'oued Zeghzzel au Maroc et signalent le rôle que joue celle-ci dans la dégradation des feuilles mortes allochtones.

II - Les organismes extrêmophiles :

2 . 1 - Définition des environnements extrêmes :

Les facteurs physico-chimiques tels que la température, pH et salinité, ont une influence directe sur la croissance et le développement de la microflore au sein d'un écosystème bien déterminé.

Dans les conditions normales, ces facteurs physico-chimiques fluctuent dans des intervalles bien précis: température 4 °C à 40 °C, pH de 5 à 8,5 et la salinité proche ou équivalente à celle de l'eau de mer. Cependant, dans certains biotopes dits extrêmes, les facteurs physico-chimiques prennent des valeurs anormales favorisant le développement d'une microflore extrêmophile très particulière ayant des optimum de croissance hors des intervalles normaux de température, de pH et de salinité (AGUILAR, 1995).

A la différence de l'environnement normal, les environnements extrêmes sont caractérisés par l'augmentation des facteurs de stress et la diminution de la diversité des espèces (RODRIGUEZ et al. 1985).

2 . 2 - Ecologie et habitats des extrêmophiles :

Dans les environnements extrêmes, la vie est conditionnée par des facteurs physico-chimiques (pH, température et salinité). Ces facteurs favorisent le développement d'une microflore extrêmophile très particulière (Halophile et thermophile).

Selon ces facteurs qui changent d'un biotope à un autre on distingue : (Tableau 1).

2 . 2 . 1 -Les Environnements thermobiotiques :

Les biotopes se répartissent sur plusieurs endroits de la planète. Ils sont caractérisés par une température très élevée moyennement comprise entre 55 °C et 60 °C (BROCK, 1986). D'autres biotopes thermobiotiques présentent une température dépassant les 100 °C. C'est le cas des sources géothermales localisées généralement dans les zones volcaniques et les fonds océaniques. La répartition de ces sources est associée à l'activité tectonique du globe.

Les sources géothermales les plus étudiées sont celles d'Iceland en Amérique du Nord (Yellowstone National Park), de New Zeland et du Japon (KRISTJANSSON et HREGGVIDSSON, 1995 ; STTETER, 1992).

Les organismes colonisant ces écosystèmes sont surtout des thermophiles ayant un optimum de croissance de 55 à 60 °C et des hyperthermophiles dont l'optimum de croissance dépasse 85 °C (SCHRONHEIT et SCHAFFER, 1995; STTETER, 1996 et PERTTULA et al. 1991).

La matière organique disponible dans ces milieux est à 50 % apportée par des organismes phototrophes tels que les algues et les cyanobactéries, cette matière organique permet la croissance et le développement des hétérotrophes.

2 . 2 . 2 -Les Sols alcalins et les sources carbonatées :

Différents types d'environnements alcalins sont connus à travers la planète. Parmi ceux-ci les sources carbonatées et les sols alcalins où le pH est généralement supérieur à 10. Dans ces écosystèmes, des espèces de cyanobactéries sont très abondantes alimentant ainsi les divers groupes hétérotrophes (Bactéries et champignons) en matière organique.

L'hydrolyse des protéines et de l'urée peut être, dans certains biotopes, la cause de l'élévation de la concentration en ammoniac et donc de l'augmentation du pH de ces milieux. Ces conditions favorisent le développement des alcalophiles. La plupart des alcalophiles sont isolés à partir du sol après enrichissement (**HORIKOSHI, 1991; HASHEM, 1993 ; RAMADANI et AGGAB, 1993**).

2 . 2 . 3 - le Lac du Soda :

Le lac du Soda se situe dans la vallée du Kenya. Des lacs semblables sont rencontrés dans d'autres endroits de la terre. Ce lac est caractérisé par un pH très alcalin variant entre 11 et 12 (**TINDALL et al, 1980 ; SHIBA, 1991**). Ces lacs hypersalés hébergent une microflore halophile et alcalophile (**LOWE et al, 1993**).

Le pH de ces lacs est déterminé par la composition ionique de leurs eaux salées et qui dépend lui même de la composition chimique des roches entourant le Lac (**GRANT et ROSS, 1986 ; OREN, 1988**).

Le lac de Soda est caractérisé par une faible teneur en Ca^{2+} et Mg^{2+} . Notons aussi que les organismes autochtones nécessitent des teneurs très faibles en ces deux ions dans leur milieu de croissance (**TINDALL et al, 1980**).

La microflore de ce lac est représentée par les bactéries photosynthétiques comme organismes autotrophes et des halophiles strictes comme organismes hétérotrophes (**KROLL, 1990**).

2 . 2 . 4 - les Lacs hypersalés :

Ces lacs diffèrent du lac du Soda par un pH moins alcalin et la composition ionique des eaux. Les plus étudiés de ces biotopes sont le grand lac salé aux Etats Unis et la mer morte (**OREN, 1988; GILMOUR, 1990 ; GRANT, 1991**).

Ce type de lac est généralement rencontré dans les zones tropicales et subtropicales où l'évaporation d'eau est accrue due essentiellement à la température élevée dans ces zones. Le pH de ces lacs, comme celui du lac du Soda semble dépendre de l'abondance des ions Ca^{2+} et Mg^{2+} .

La composition ionique des eaux du grand lac salé ressemble à celle de l'eau de mer. Les eaux sont légèrement alcalines (pH = 7,7) , concentrées en Mg^{2+} et peu concentrées en Ca^{2+} . Cependant la mer morte a un pH légèrement acide (pH de 5,9 à 6,3) et concentrée en ions Ca^{2+} (0,4 M) et Mg^{2+} (1,8 M) (**OREN, 1988; GRANT, 1991 et KRISTJANSSON et HREGGVIDSSON, 1995**).

Les organismes autochtones nécessitent des teneurs élevées en ces ions dans leur milieu de culture. Ces lacs hypersalés renferment surtout les organismes photosynthétiques (**Tableau 2**).

Tableau 1 : Paramètres physico-chimiques (Température, pH et salinité) des plus importants biotopes extrêmes (KRISTJANSSON et HREGGVIDSSON, 1995)

<u>Habitats</u>	<u>Température (°C)</u>	<u>pH</u>	<u>Salinité (% W/V)</u>
- Sources géothermales	> 60	> 7	< 6
- Sols alcalins et sources carbonatées	< 50	> 8	< 6
- Lac du Soda	< 50	> 9	> 10
- Lacs Hypersalés	< 50	5 à 8	> 10

Tableau 2 : Organisation de la communauté microbienne dans les lacs hypersalés (KRISTJANSSON et HREGGVIDSSON, 1995)

<u>Sources d'énergie</u> <u>Producteurs</u> <u>primaires</u> <u>(Autotrophes)</u>	<u>Organismes représentatifs</u>	<u>Salinité (NaCl mole/l)</u>		
		<u>Minimum</u>	<u>Optimum</u>	<u>Maximum</u>
- H ₂ O/ lumière	<i>Dunaliella. sp.</i>	0,3	--	5,0
- H ₂ O/ lumière	<i>Aphanocapsis. sp.</i>	1,5	--	2,2
- m. org/ lumière	<i>Halobactérium. sp.</i>	--	2,0	5,5
<u>Consommateurs</u> <u>(hétérotrophes)</u>				
m. org / O ₂	<i>Halobactérium. sp.</i>	--	2,0	5,5
m. org / NO ₂	<i>Halobactérium</i> <i>denitrificans</i>	1,5	2,5	4,5
MeNH ₃ / CO ₂	<i>Methanohalobium</i> <i>evestigatus</i>	--	--	4,3

m. org : matière organique

2.3 - Les champignons dans les environnements extrêmes :

2.3.1 - Champignons thermophiles :

La température est parmi les facteurs essentiels déterminant la croissance et la distribution de nombreuses espèces fongiques.

Les champignons peuvent vivre sur un large intervalle de température. Ils ont été classés en psychrophiles, mésophiles et thermophiles. La plus part des mésophiles poussent entre 5 °C et 37 °C. Cependant les espèces fongiques, capables de pousser à des températures dépassant 45 °C, sont rares et peuvent être divisés en deux catégories; thermophiles et thermotolérants (COONELY et EMERSON, 1964).

EVANS, (1971) étudia les températures critiques pour la croissance et le développement de 35 souches fongiques et classa ces souches en :

- Thermophiles strictes avec une température minimale de croissance de 25 °C ou plus.
- Thermophiles modérés avec une température minimale de 20 °C et un maximum de 50 °C ou plus.
- Thermotolérants stricts ayant une croissance médiocre à 20 °C et bonne à partir de 50 °C.
- Thermotolérants en général qui poussent bien à des températures inférieures à 50 °C.

2.3.1.1 - Bases de la thermophilie :

De nombreuses hypothèses ont été émises pour tenter d'expliquer la thermophilie et la thermorésistance de certains espèces fongiques. Parmi elles on peut citer les plus éventuelles: solubilité des lipides membranaires, renouvellement rapide des métabolites essentiels, thermostabilité moléculaire et enfin thermostabilité ultrastructurale. Dans une étude critique de ces hypothèses, CRISAN (1973) soutient la dernière qui selon lui est la seule à pouvoir expliquer l'adaptation des organismes aux températures élevées. Ils montre qu'à l'échelle ultrastructurale, le changement dans le degré d'insaturation des lipides membranaires, peut affecter le métabolisme cellulaire et indique qu'aux températures élevées, l'excès de fluidité des lipides diminue la sélectivité membranaire et affecte l'activité des enzymes membranaires. Par contre à des températures minimales, les lipides sont très peu fluides ce qui ralentit les mécanismes de l'endocytose et l'exocytose cellulaire. Ainsi donc l'hypothèse de la thermostabilité ultrastructurale expliquer le phénomène de la thermophilie par le changement dans le degré de saturation des lipides membranaires permettant ainsi une certaine flexibilité membranaire et donc une adaptation de l'organisme aux conditions extrêmes de température.

2.3.1.2 - Variété et distribution des champignons thermophiles :

La plus part des champignons thermophiles appartiennent aux *Ascomycètes* et *Deutéromycètes*. Mais certaines espèces thermophiles appartiennent aux *zygmycètes* tels que *Mucor miehe* et *Mucor pusillus*. Cependant peu de champignons aquatiques thermophiles sont connus. Ces derniers peuvent être isolés sur des milieux de culture contenant l'extrait de levure, l'amidon et le glucose (COONELY et EMERSON, 1964).

Les champignons thermophiles sont largement distribués. On les rencontre généralement dans les compostes de champignons comestibles (GERBEN *et al*, 1994), dans les entrepôts de stockage des grains, dans les sources géothermales (Yellowstone Park) et enfin dans les lacs salés et les sols volcaniques (HARRY, 1986). De son côté

HEDGER,(1975) signale l'existence d'un grand nombre de champignons thermophiles dans les sols tropicaux et mentionne leur performance dans l'humification de ces sols.

2.3.2 - Champignons Xérophiles :

Comme tous les organismes, les champignons peuvent se développer dans les milieux où l'eau est le solvant. Ils peuvent altérer dans les conditions favorables d'humidité, les matériaux potentiellement dégradables causant ainsi leur pourrissement. Pour limiter les dégâts causés par ces champignons, les matériaux sont conservés dans des conditions d'humidité très basse diminuant ainsi l'activité de l'eau (Aw). La Aw exprime la quantité d'eau disponible qui peut être utilisée par l'organisme contaminant.

Certaines espèces fongiques sont capables de se développer à des Aw très réduites. Elles sont communément nommées champignons Xérophiles. **PITT** (1975) a défini les champignons xérophiles comme étant des champignons capables de pousser à des Aw inférieures à 0,85. De son côté **GRIFFIN**, (1981) divisa ce groupe de champignons en Xérophiles ayant un optimum de croissance à une Aw inférieure à 0,96 et en Xérotolérants avec un optimum de croissance à des Aw comprises entre 1,00 et 0,96

Depuis, de nombreux travaux ont été consacrés à ce groupe de champignons. Ainsi **PITT** et **HOCKING**, 1987 et 1988 isolèrent de nombreux champignons Xérophiles à partir de saumures de viande de poissons et indiquèrent la dominance des espèces *Eurotium*, *Paecilomyces* et *Basidiospora*.

2.3.3 - Champignons Halophiles :

La tolérance à la salinité a fait l'objet de nombreux travaux. Ainsi **KUSHNER**, (1978) classe les micro-organismes en cinq catégories: non halophile, faible halophile, halophiles modérés, halophiles extrêmes limites et halophiles extrêmes (**Tableau 3**). De son côté **RUSSEL**,(1988) classe les micro-organismes halotolérants en trois groupes: halotolérants en général, halotolérants modérés et halotolérants extrêmes (**Tableau 4**).

Enfin **PITT**(1988) définit les champignons halophiles comme étant ceux capables de pousser plus rapidement sur des milieux contenant du NaCl que sur ceux contenant du glucose ou du fructose et ceux-ci à des Aw comprises entre 0,80 et 0,90 et à des températures de 20, 30, 34 et 37 °C.

Les plus importants travaux effectués sur ce groupe de champignons sont ceux de **PITT**, (1987)et (1988) et de **MOUBASHER et al.**, 1991 qui ont isolés cent espèces fongiques halophiles et halotolérantes à partir des sols d'Egypte et étudièrent leurs tolérances aux différentes concentrations en NaCl (de 0 à 25 % de NaCl).

2.3.4 - Bases de la Xérophilie :

La plus part des micro-organismes possèdent des mécanismes de régulation du stress hydrique, mais très peu d'entre eux peuvent se développer en s'adaptant physiologiquement dans des systèmes où l'activité de l'eau est très réduite.

La stratégie employée par ces micro-organismes diffère d'un germe à un autre mais l'approche est la même; c'est l'accumulation interne de soluté pour contrebalancer la tension externe et équilibrer ainsi la Aw de part et d'autre de la membrane. La nature de ces solutés diffère selon le micro-organisme en question (**Tableau 5**).

Les halobactéries maintiennent leur balance osmotique par l'accumulation des ions K^+ . Le rapport K^+/Na^+ est très élevé et varie entre 2/1 et 5/1 (SPEELMANS et al, (1995). D'autres bactéries accumulent des acides aminés tels que proline et/ou glutamine. Cependant la Bétaine peut être accumulée par certaines bactéries halophiles. HOCKING,(1988) rapporte l'accumulation de glycine et de bétaine par une espèce de cyanobactérie *Cyanobacterium* *syn.* Les protéines de ces micro-organismes semblent s'adapter à ces conditions extrêmes de salinité par leur richesse en résidus acides aminés acides comparées aux protéines des organismes non halophiles (ZACCAI et EISENBERG, 1991).

Cependant les champignons et en réponse à la diminution de l'activité de l'eau dans le milieu de culture accumulent des alcools polyhydriques ou des polyols. ZIDAN et ABDELMALEK, (1987) rapportent l'accumulation du glycérol par des espèces de *Aspergillus* cultivés sur des milieux salés. Le glycérol est également accumulé par certaines levures exposées au stress hydrique durant leur croissance sur les milieux salés(GUSTAFSSON et NORKANS, 1976; BROWN, 1978; ALDER et GUSTAFSSON, 1980; ALDER et al, 1985).

Tableau 3 : Classification des organismes en fonction de leur tolérance à la salinité (KUSHNER, 1978).

<u>Catégories</u>	<u>Réaction vis avis de la concentration en NaCl</u>
Non halophiles	Poussent bien à une [NaCl] < 4 %
Faibles halophiles	Poussent bien à 4 % de NaCl
Halophiles modérés	Poussent bien entre 3 % et 15 %
Halophiles extrêmes limites	Poussent bien entre 10 % et 25%
Halophiles extrêmes	Poussent bien entre 15 et 30 %

Tableau 4 : Classification des micro-organismes halotolérants RUSSEL, (1988).

<u>Catégorie</u>	<u>Réaction vis avis de la concentration en NaCl</u>
- Halotolérants faibles	Peuvent pousser jusqu'à 10 % de NaCl
- Halotolérants modérés	Peuvent pousser jusqu'à [NaCl] ≤ 10 %
- Halotolérants extrêmes	Peuvent pousser jusqu'à [NaCl] ≤ 15 %

Tableau 5 : Solutés régulateurs de l'activité de l'eau (aw) chez les micro-organismes (HOCKING, 1988).

<u>Micro organismes</u>	<u>Solutés accumulés</u>	<u>Aw minimale de croissance</u>
Cyanobactéries des eaux douces	Sucrose	0,98
Cyanobactéries marines	α-glycosyl glycerol	0,92
Cyanobactéries des lacs salés	Bétaine	0,90 - 0,75
Bactéries marines	Proline, glutamate	0,95
Bactéries halophiles	K+	0,75
Bactéries en général	Glycine-bétaine	0,97 - 0,90
Algues des lacs salés	Glycérol	0,75
Algues en général	Proline, mannitol	0,96
Levures xérophiles	Glycérol	0,83 - 0,62
Champignons filamenteux xérophiles	Glycérol	0,72 - 0,61

III - Importance des micro-organismes extrémophiles en biotechnologie :

Les organismes extrémophiles suscitent un intérêt particulier en raison de leur potentiel important dans la production de biomolécules hautement stables aux conditions physico-chimiques extrêmes.

La biotechnologie des extrémophiles est venue combler le vide existant entre les processus biologiques et chimiques. En effet seules les enzymes produites par ces micro-organismes sont potentiellement actives dans les conditions extrêmes de température, pH et salinité. Dans ces conditions le risque de contamination par les germes opportunistes est écarté (AGUILAR, 1996 et KRAHE et al, 1996).

L'intérêt commercial des enzymes thermostables extraites à partir des organismes hyperthermophiles est illustré par la large utilisation de la DNA- polymérase appelée aussi Taqua-polymérase isolée à partir de *Thermus aquaticus* et *Pyrococcus. sp*, dans l'amplification enzymatique de l'ADN (PCR). Cette technique a ouvert la voie vers le sondage du génome humain. Cependant l'intérêt des halophiles et alcalophiles dans l'industrie enzymatique ressort des travaux effectués par HORIKOSHI, (1996) et VENTOSA et NIETO, (1996) qui ont mis l'accent sur l'intérêt de ces micro-organismes dans la production d'enzymes alcalophiles. Le développement biotechnologique récent, confirme l'intérêt de ces extrémophiles en tant qu'une source inépuisable de nouveaux catalyseurs pour la bio-industrie.

Certaines de ces enzymes ont été isolées et leur gènes sont clonés et exprimés dans des hôtes mésophiles. Le **tableau 6** résume l'opportunité des extrémophiles pour la bio-industrie.

Les champignons présentent également des performances industrielles intéressantes. Ils sont largement utilisés dans les industries alimentaires, pharmaceutiques et dans la biodégradation (**Tableau 7**).

3.1 - Industrie enzymatique :

Les champignons connus par leur équipement enzymatique très développé, constituent une source majeure d'enzymes de performance industrielle (SMITH et BERRY, 1975).

3.1.1 - Hydrolases de l'amidon :

L'amidon est l'un des polysaccharides les plus abondants. Il est composé de deux fractions à haut poids moléculaire: l'amylose (15 % à 25 %) et l'amylopectine (75 % à 85 %) (MERCIER, 1982).

L'habilité à utiliser l'amidon comme source de carbone et d'énergie est une des propriétés de plusieurs bactéries et champignons (ANTRANIKIAN, 1992).

3.1.1.1 - α - amylase :

C'est une endoenzyme catalysant l'hydrolyse des liaisons internes α (1 - 4) glucosidique. Les produits d'hydrolyse présentent une configuration α (FOGARTY and KELLY, 1980).

La présence de Ca^{2+} permet une amélioration de la stabilité de l'enzyme aux conditions extrêmes de pH et de température (GODON, 1991)

ZHONG et al. (1994) ont réussi à purifier et caractériser des α -amylases thermoactives ayant une température optimale d'activité de 100 °C et un pH de 5. Ces α -amylases sont hautement stables et gardent leur activité après autoclavage pendant 5 heures. De son côté **PATEL et al.** (1993) étudièrent la production d'une α -amylase par *Halobacterium halobium* - bactérie halophile stricte. Cette enzyme conserve son activité jusqu'à 25 % de NaCl

3.1.1.2 - Glucoamylase ou amyloglycosidase :

C'est une exoenzyme hydrolysant les liaisons α (1 - 4) et α (1 - 6) de l'amylose et l'amylopectine donnant naissance à des molécules de glucose en anomérie β (**FOGARTY et al.** 1980). Le poids moléculaire est très variable selon l'origine. Il est compris entre 95500 et 97500 (**JOHN et al.** 1990).

KENGEN et al. (1993) isola une glucosidase thermoactive avec un maximum d'activité de 105 °C. Cependant certaines glucosidase thermostables ont été isolées à partir d'espèces fongiques.

Ces enzymes amylolytiques trouvent leur applications dans divers secteurs industriels. Elles sont très utilisées en industrie amidonnière pour la production de maltodextrine ou de sirop de glucose (**MERCIER**, 1982 ; **FLECHE**, 1976). Elles sont également utilisées dans la clarification des jus de fruit. Enfin la panification emploie les amylases fongiques qui permettent l'augmentation de la fermentescibilité des pâtes.

3.1.2 - Enzymes protéolytiques :

Ces enzymes sont responsables de l'hydrolyse des protéines en peptides et acides aminés libres. De nombreuses protéases thermophiles et alcalophiles ont été isolées à partir de micro-organismes extrémophiles (**ANTRANIKIAN et LEUSCHNER**, 1995).

Des protéases thermoactives ont été identifiées à partir de nombreux extrémophiles appartenant aux genres *Pyrococcus*, *Thermococcus* et *Desulfurococcus* (**KLINGEBERG et al.** 1992 et 1994).

Chez les champignons on note les travaux de **MOUTAOUAKIL et al.** 1993 qui ont isolé et identifié une protéase alcaline à partir de *Aspergillus fumigatus*. Cette enzyme est utilisée pour dégrader le collagène fibrinogène et élastine. Sa production est induite par la présence de protéines (Collagène, fibrinogène ou caséine) dans le milieu de culture (**REICHARD et al.** 1990 ; **FROSCO et al.** 1992).

D'autres enzymes d'origine fongique sont produites à l'échelle industrielle. Elles sont résumées dans le **Tableau 8**.

3.2 - Industrie pharmaceutique :

Depuis la découverte de la Pénicilline par **FLEMING** en 1929 et son importance économique le nombre d'antibiotiques découverts n'a cessé d'augmenter (**LARPENT et SANGLIER**, 1989). On dénombre actuellement environ 14.000 molécules antibiotique

Les champignons occupent une place importante parmi les organismes producteurs avec un pourcentage de 19,5 % des antibiotiques produits. Ces champignons produisent une large gamme d'antibiotiques actuellement connues. Certaines espèces fongiques produisent des agents antitumoraux et antiviraux. En effet et parmi les 300 agents antitumoraux isolés, $\frac{3}{4}$ sont obtenus à partir d'actinomycètes, 11 % à partir de bactéries et 13 % à partir de champignons soit 43 agents (**WAINWRIGHT**, 1992).

Tableau 6 : Application biotechnologiques des organismes extrémophiles (AGUILAR, 1996).

Micro organismes	Métabolites	Applications
Thermophiles 50 - 110°C	Amylases Xylanases Protéases	Glucose, fructose en sucreries Blanchir le papier production d'acides aminés à partir des Kératines, industrie alimentaire, fermentation détergents
Psychrophiles 5 - 20°C	D.N.A polymerases Protéases neutres Protéases Amylases Lipases Acides gras polyinsaturés	Manipulations génétiques Maturation du fromage Industrie laitière Détergents Industrie pharmaceutique
Acidophiles pH < 2 Alcalophiles pH > 9	Oxydation du sulfure Protéases Amylases Lipases Cyclodextrines	Desulphurisation du charbon Détergents Stabilisation des substances volatiles
Halophiles 3 - 20 % de sel	Antibiotiques Carotène Glycérol Membranes	Industrie pharmaceutique colorant alimentaire, surfactants pour l'industrie pharmaceutique

Les plus connus de ces agents sont les glucans, composants majeurs de la paroi de *Grifola sp* (champignons supérieur). Cet agent induit la synthèse de l'interféron nécessaire pour le déclenchement de la réaction immunitaire. Il peut être extrait du mycélium, des organes de fructification et des sclérotés. Certaines sociétés japonaises produisent le GF₁ à partir de *Grifola frondosus*. Cet agent attaque Sarcoma-180 (JONG et BIRMINGHAM, 1990).

D'autres champignons produisent des enzymes à usage médicale tel que les amylases acides produites par *trichoderma viridae* utilisées comme aide digestif. Les lipases extraites d'*Aspergillus oryzae* et de *Candida lipolytica* sont mis à contribution pour compenser le déficit en lipases pancréatiques (WAINWRIGHT, 1992).

IV -IMPORTANCE ECOLOGIQUE DES CHAMPIGNONS :

Les micro-organismes jouent un rôle fondamental dans l'équilibre biologique de la nature , ceci étant liés , d'une part à leur contribution à la solubilisation d'un bon nombre d'éléments alimentaires dans le sol , et d'autre part à leur capacité de dégrader les composés chimiques entre autre les herbicides . Ils peuvent les utiliser comme source d'azote , de phosphore et de carbone , exemple le 2,4 dichlorophynoxy acetic acide (2,4-D). (SMITH,1989).

4 . 1 - Dégradation du 2,4-D :

Le 2,4-D dérivé de groupe phénoxy , c'est un herbicide organique utilisé principalement pour le désherbage des céréales , et cela au moment de la germination .

Cependant , la plupart des dicotylédons peuvent être détruites , mais leurs sensibilités varie beaucoup selon les espèces , ainsi que suivant le stade de développement .

Le traitement du sol par le 2,4-D ouvre un champ d'activité microbienne surtout fongique en l'utilisant comme source d'énergie et de carbone .(SMITH et MORTENSEN, 1991).

La figure 1 éclaircit l'une des voies de transformation du 2,4-D par des micro-organismes telluriques (MARTIN, 1982).

4 . 2 - Biodégradation des hydrocarbures aromatiques:

On distingue les hydrocarbures monoaromatiques dont le plus simple est le Benzène et les hydrocarbures polyaromatiques telque le Caronen (heptaaromatique).

L'aptitude à dégrader les hydrocarbures est une propriété de diverses familles de microorganismes . Cette capacité est reconnue surtout chez les bactéries , les levures les champignons filamenteux , les actinomycetes et les algues unicellulaires. Parmi les champignons filamenteux , les plus fréquemment cités et isolés a partir du sol appartiennent aux genres *Aspergillus* , *Cladosporium* , *Penicilium* , *Trichoderma* , *Cunninghamella* et *Mortierella* (HALOUI , 1989). Cependant d'autres espèces ont été isolées du milieu marin . Elles appartiennent pour la plus part aux genres *Aspergillus* et *Penicillium* (LINDLEY et al , 1986).

Ainsi nous constatons donc que peu d'études ont porté sur les champignons en les comparant aux travaux effectués sur les bactéries. Ceci nous a poussé à s'intéresser à ce type de microorganismes.

Dans ce cadre de recherche nous nous sommes proposés d'aborder les points suivants :

Dans la première partie, nous effectuerons un isolement, une identification de la mycoflore du lac. Nous étudierons par la suite les degrés de l'halotolérance et de la thermotolérance, puis la distribution de cette mycoflore sur les différentes stations du lac.

Dans la deuxième partie, nous évaluerons l'aptitude des souches halotolérantes et thermotolérantes à produire des enzymes, des antibiotiques et dans la dégradation des composés aromatiques. Les souches performantes seront sélectionnées pour une étude préliminaire des molécules qu'elles produisent (enzymes et antibiotiques).

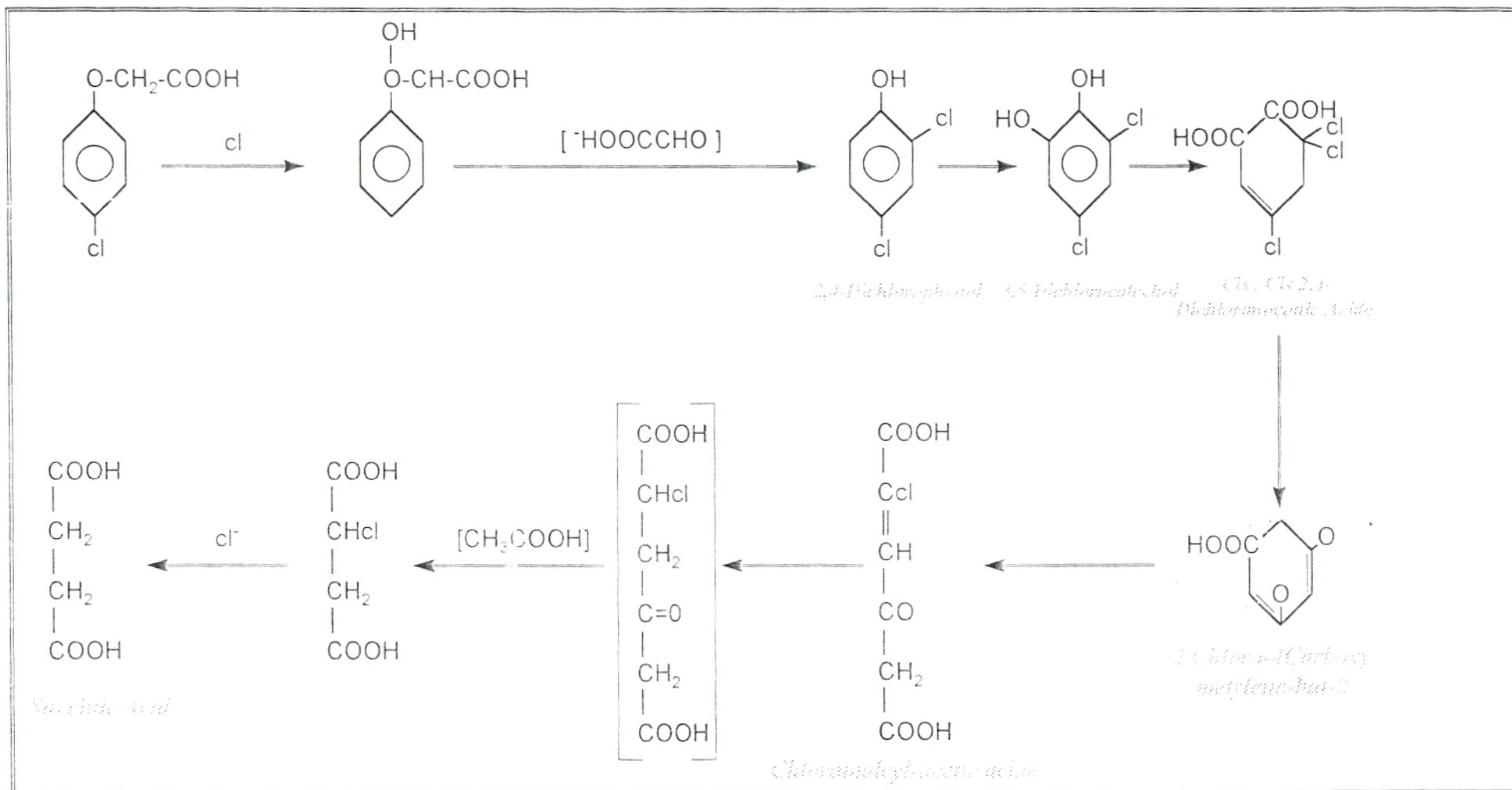


Figure 1 / VOIE DE DEGRADATION DU 2,4 - D (MARTIN, 1982)

Tableau 7 : Métabolites fongiques à intérêt industriel (WAINWRIGHT, 1992).

Organismes producteurs	Métabolites
Antibiotiques	
<i>Cephalosporium acremonium</i>	Cephalosporine C
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Fumagillin
<i>Fusidium Coccineum</i>	Acide Fusidique
<i>Penicillium sp.</i>	Griseofulvin
<i>Penicillium chrysogenum</i>	Penicillin
<i>Helminthosporium Siccans</i>	Siccanin
Acides organiques	
<i>Aspergillus niger</i>	Acide citrique
<i>A. niger</i>	Acide gluconique
<i>A. terreus</i>	Acide Itaconique
Enzymes	
<i>Aspergillus sp.</i>	Lipases, Proteases
<i>A. niger</i>	β -glucanase, Cellulase, Glucoamylase, Glucose Oxyclase, Lactase, Pectinase
<i>A. oryzae</i>	α - amylase
<i>A. awamori</i>	Glucoamylase
<i>Trichoderma sp.</i>	Dextranase, Cellulase
<i>Penicillium sp.</i>	Dextranase
<i>Mucor sp.</i>	Rennin

Tableau 8 : Enzymes fongiques à intérêt industriel (WAINWRIGHT, 1992)

Enzymes	Applications	Espèces productrices
Alpha-amylase	Industrie de pain	<i>Aspergillus niger</i> <i>A. oryzae</i> , <i>A. awamori</i>
Glucoamylase	Sucrochimie	<i>A. niger</i> , <i>Rhizopus foetidus</i>
Lactase	Additifs alimentaires	<i>Aspergillus oryzae</i> , <i>Kluyveromyces lactis</i> , <i>Torula cremoris</i>
Invertase	Sucrochimie	<i>A. niger</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Pectinases	Industrie alimentaire	<i>A. niger</i> , <i>A. Wentii</i> <i>Rhizopus sp.</i>
Lipases	Détergent	<i>Penicillium roqueforti</i> , <i>Rhizopus delmar</i>
Proteases acides	Industrie du pain	<i>A. Soitoi</i> , <i>Mucor pusillus</i>
Pénicilline acylases	Pénicilline semi-synthétique	<i>Penicillium chrysogenum</i> , <i>Aspergillus ochraceus</i> , <i>Trychophyton</i>
Cellulase	Recherches	<i>Trichoderma viridae</i> <i>Aspergillus niger</i>

Première partie

**Etude de la Mycoflore
du lac d'El Goléa
Systématique et distribution**

Introduction

Dans les environnements extrêmes tels que les chotts et les sebkhas, la vie est conditionnée par des facteurs physico-chimiques (pH, température et salinité). Ces facteurs favorisent le développement d'une microflore extrémophile particulière (halophile et thermophile).

De nombreux travaux ont porté sur ces biotopes extrêmes en vue de les caractériser. Les plus importants effectués dans ce domaine sont ceux d' **OREN (1988)** et **GILMOUR (1990)** qui ont décrit les lacs hypersalés les organismes halophiles.

Le lac d'El Goléa constitue un écosystème extrême en raison de sa situation géographique et de sa salinité. Certains travaux ont été effectués sur ce lac. Parmi ces travaux on note ceux de **BOUBATRA & BOUDJELLAL** (magistères en cours) qui ont étudié respectivement la flore alguale et bactérienne du lac. Cependant la flore fongique fera l'objet de cette présente étude. Dans cette partie nous allons effectués une étude systématique de la mycoflore de ce lac et voir la distribution de celle ci sur les différentes stations du lac.

I - Présentation du milieu :

El Goléa est une oasis qui s'allonge sur plus d'une dizaine de kilomètres dans la vallée de l'oued Seggeur. Elle se situe à 480 Km **D'In Salah** au Sud et à 260 Km de **Ghardaia** au Nord-Est (figure2).

1.1 - Climat :

Dans la région d' El Goléa, le climat est typiquement Saharien. Il est caractérisé, selon sa situation, dans le climatogramme d'**EMBERGER** par:

- La faiblesse et l'irrégularité des précipitations (moins de 100 mm/an)
- Des températures très élevées à fortes amplitudes journalières;
- Les vents sont fréquents dans la région; ils se manifestent par la création de courants d'échanges thermiques forts et de fortes températures.

1.2 - Description du Lac:

Le lac se situe au sud d' El Goléa entre un plateau de 100 m de hauteur environ et les dunes de l'erg. Il s'étend sur une longueur de 6 à 7 km. Ce lac à pour origine une ancienne dépression (sebkha) et prend de plus en plus d'ampleur, suite à l'exploitation importante des ressources en eau non renouvelables des nappes profondes. Il est alimenté par:

- Les eaux domestiques de la ville d'El Goléa qui compte 4.000 Habitants;
- Les eaux de drainage de la palmeraie;
- Les eaux de pluies qui sont très faibles.

Ce lac a été subdivisé en quatre stations selon le degré de pollution, le niveau d'eau et la concentration en sel (salinité)

Station I: C'est le début du lac. Elle reçoit les rejets de la ville: et compte environ 100 m de long et 80 m de large; la profondeur varie entre 40 et 60 cm; c'est la station la plus polluée.

Station II : Elle a environ 200 à 300 m de long et 120 m de large. La profondeur varie entre 30 et 80 cm selon les saisons: la pollution y est aussi importante que dans la station I.

Station III : L'eau y est très profonde (2 à 3 m). Cette station est longue de 500 m et large de 200m .

Station IV : C'est la sebkha proprement dite, de 4 à 5 km de long et de large, sa profondeur est de 30 à 50 cm. Elle est sèche de Juin à septembre. Durant cette période, le sel est extrait et commercialisé dans le souk de la ville.

Aux abords du lac, et parfois à l'intérieur, on trouve une végétation de type halophyte (**QUEZEL** et **SAMTA**, 1962), surtout de **tamarix**, **phragmites**, **typha**, **limonastrum**, et des **Juncus**. Beaucoup d'oiseaux, de batraciens, et d'insectes, surtout des moustiques y trouvent aussi refuge.

La flore alguale du lac est principalement représentée par des algues macroscopiques et microscopiques, des **diatomées chlorophycées** et **cyanophycées BOUBATRA** (magister en cours). La flore bactérienne est abondante et très diversifiée, mais les halophiles sont les plus représentées **BOUDJELLAL** (magister en cours).



II - Matériels et méthodes :

2.1 - Prélèvements :

Des prélèvements ont été effectués durant trois périodes choisies notamment en fonction du débit; les hautes eaux (11 Janvier); Les moyennes eaux (10 Octobre) et l'étiage (01 Juin). Les prélèvements ont été effectués sur 3 années (1994 , 1995 et 1996)

Ces prélèvements ont été réalisés sur le bord du lac et dans les marées périphériques. 5 échantillons d'eau ont été prélevés de chacune des quatre stations du lac. Nous avons rempli stérilement au 3/4 5 bouteilles de 1000 ml et des flacons de 250 ml stériles. Notons qu'au moment des prélèvements, nous avons relevé la température et le pH ainsi que les caractères organoleptiques de l'eau; car certains caractères tels que: l'odeur et la couleur disparaissent pendant le transport (**RODIER, 1976**).

2.2 - Analyses des échantillons au laboratoire:

Les échantillons prélevés dans les bouteilles de 1000 ml ont servi aux analyses physico-chimiques, dans les 48 H qui suivent les prélèvements. Les flacons de 250 ml sont conservés à 4 °C et ont servi aux analyses microbiologiques.

2.2.1 - Analyses physico - chimiques:

Les principaux paramètres mesurés sont:

2.2.1.1 - Paramètres physico - chimiques

Il s'agit de la mesure du pH, la conductivité électrique, la turbidité et le résidu à sec à 105 °C.

2.2.1.2 - Paramètres de pollutions organiques:

La présence de certaines substances chimiques est une indication à une pollution des eaux (**LECLERC, 1975**). Ces substances sont: les nitrites, ammoniac et le phosphate.

2.2.1.3 - Dosage des sels ou minéralisation globale:

Les matières minérales présentes dans l'eau sont essentiellement des sels tel que: les carbonates, sulfates et chlorures et les métaux, comme le Ca^{++} , Mg^{++} , Na^+ et K^+ . La teneur globale en ces minéraux est caractérisée par le titre Hydrométrique (TH), qui indique la dureté totale en degré Hydrométrique (HY) et le titre alcalimétrique complet (T.A.C) représenté par la dureté temporaire ou carbonaté

Toutes ces analyses ont été effectuées aux laboratoires de contrôle des eaux de l'EPEAL-KOUBA -Alger.

2.2.2 - Analyses microbiologiques:

Pour l'isolement et le dénombrement des champignons contenus dans les échantillons d'eau des quatre stations du lac, nous avons suivi les étapes suivantes:

2.2.2.1 - Préparation des milieux de culture :

Trois milieux de culture ont été utilisés; la gélose Sabouraud, le Czapek's Dox Agar (C.D.A) et Corn Meal Agar (C.M.A), à chaud avec ou sans NaCl (non iodé) afin d'obtenir les concentrations suivantes: Témoin (T), 3 %, 10 %, 20 %, 25 %, et 30 % de NaCl. Après

désolution du sel, nous ajoutons de la Gentamycine à raison de 500 UI afin d'inhiber la croissance des bactéries.

2 . 2 . 2 - Inoculation :

Le milieu de culture en surfusion (45 °C) est coulé à raison de 15 ml dans des boîtes de Petri contenant 1 ml d'échantillon d'eau. Les boîtesensemencées sont incubées à 25 °C (pour la recherche des mésophiles) et à 45 °C (pour la recherche des thermophiles), pendant 48 heures à 15 jours. Toutes les colonies ont été isolées et dénombrées .

2 . 2 . 3 - Repiquage et isolement des souches :

Les colonies représentatives de chaque type de souches ont été isolées et ceci en tenant compte de l'aspect de la colonie et de la couleur. Ces colonies ont été transférés dans des boîtes de Pétri contenant le même milieu, à la même concentration en NaCl.

2 . 2 . 4 - Conservation des souches :

Après repiquage, les souches pures sont conservées en tubes inclinés que nous avons maintenus pendant une à deux semaines à la température convenable à leur développement. Ces souches sont ensuite conservées à 4 °C.

2 . 2 . 5 - Identification des souches :

Les boîtes sont examinées durant et après l'incubation à l'oeil nu et au binoculaire. L'étude détaillée des caractères morphologiques et cultureux a été réalisée en utilisant la méthode de microculture, décrite par **HARRIS**, nous a permis l'identification du genre.

Cette technique consiste à cultiver les champignons sur des lames contenant des carrés de gélose (4 x 4 mm) inoculés par les spores des champignons à identifier et recouverts par des lamelles. Les lames sont placées dans des boîtes de 13 cm de diamètre contenant du papier watman imbibé d'eau pour humidifier l'atmosphère et empêcher ainsi la dessiccation rapide de la gélose. Après incubation de 3 à 5 jours, les lamelles, auxquelles s'adhère le mycélium sont transférées sur d'autres lames stériles contenant quelques gouttes de lactophénol pour une observation microscopique. Pour déterminer les souches obtenues, nous avons fait appel aux caractères cultureux et à la morphologie.

2 . 2 . 5 . 1 - Caractères cultureux :

Ils concernent essentiellement :

- La mesure de la vitesse de croissance, par la mesure du diamètre de la colonie après incubation ;
- la texture du thalle, qui peut être : veloutée, laineuse, mousseuse ou floconneuse ;
- la couleur du thalle, concerne surtout la pigmentation du mycélium ;
- la couleur du revers de la culture, et la présence ou non du pigment diffusible ;
- la présence ou l'absence d'exsudats.

2 . 2 . 5 . 2 - Caractères morphologiques:

Les observations ont été faites sous un microscope de type Zeiss, aux grossissements : 10x, 40x et 1000x. Les caractères suivants ont été notés :

- la couleur du mycélium ;
- absence ou présence de cloison ;

- l'ornementation des parois ;
- la longueur des ramifications ;
- la différenciation des thallospores.
- la nature des organes différenciés tels que : zygospores, sporocytes, conidiophores et sclérotés ; forme, couleur, dimension et texture des parois et ornementation.

Ces caractères morphologiques et culturels sont notés puis photographiés. L'identification des souches a été effectuée en se référant au guide de **BARNETT et BARRY**, (1972) ; **BOTTON et al.**, (1990) ; **RAPPER et FRENEL**, (1977) ; **BOOTH**, (1971).

Pour l'identification des espèces de *Penicillium* et d'*Aspergillus*, nous avons utilisé la méthode de **PITT**, (1973). Celle-ci repose sur la relation entre l'activité de l'eau du milieu de culture et la température d'incubation. Pour cela deux milieux de culture ont été utilisés; Czapek's Yeast Agar (CYA) et Glycérol Nitrate Agar (G25N) à différentes températures 5 °C, 37 °C, et 25 °C.

L'inoculum est préparé selon la méthode de « mono- spore », qui consiste à la mise dans une suspension, semi solide à base 0,2 % d'Agar et 0,05 % de Tween 80 de spores d'une culture de champignon âgée de sept (07) jours.

Le milieu G25N est inoculé par une seule souche en trois points et par deux souches différentes en deux points chacune. Les boîtes inoculées sont incubées à 25 °C pendant sept jours.

Concernant le milieu CYA, les boîtes incubées à 5 °C sont inoculées en trois points par une seule souche; celles incubées à 37 °C sont inoculées en un point par une seule souche et en deux points par deux souches différentes

La lecture des résultats s'effectue après sept jours d'incubation en mesurant les diamètres des colonies en les comparant et en les rapportant à la clé de **PITT** pour l'identification des espèces.

2 . 2 . 3 - Détermination des optimums de température et de salinité :

Cette étude a concerné seulement les souches ayant poussé à 20 % de NaCl et plus et à 45 °C. Ce test est effectué dans le but de connaître les limites extrêmes de NaCl et de températures tolérées et les plus convenables à leurs croissances. Pour cela nous avons repiqué les souches dans des flacons de 250 ml contenant 50 ml du milieu approprié à des concentrations croissantes de NaCl: 3 %, 10 %, 20 %, 25 %, et 30 % . Un témoin sans NaCl est aussi préparé. Les flacons sont incubés à différentes températures: 20 °C; 25 °C, 30 °C, 35 °C, 45 °C et 55 °C pendant 48h à 15 jours.

Les optimum de températures et de salinité admis sont estimés par la mesure du poids sec.

2 . 2 . 5 - Distribution de la mycoflore du lac dans les quatre stations :

Cette étude est effectuée dans le but de voir s'il y a une éventuelle adaptation des souches par rapport à d'autres dans ces milieux extrêmes.

III - RESULTATS ET DISCUSSION

3 . 1 - Paramètres organoleptiques de l'eau :

L'eau des trois premières stations (I, II, III) est de couleur noirâtre due essentiellement aux substances en suspension (algues, matières organique et débris divers). La pollution est donc visible à vue d'oeil . Par contre l'eau dans la station IV est d'apparence limpide et sans odeur. Toutefois en pénétrant dans la sebkha, on note que l'eau initialement limpide devient noirâtre, avec la remontée en surface de la matière organique . Ainsi donc l'eau de cette station est aussi polluée .On constate donc le danger lié à l'utilisation du sel extrait de la sebkha dans le commerce.

3 . 2 - Analyses physico-chimiques :

3 . 2 . 1 - Paramètres physico-chimiques :

L'eau des différentes stations et au cours des trois prélèvements présente un pH alcalins, variant entre 8 et 9 Ce résultat a été signalé par **BAUDRIMONT, (1974)** qui a travaillé sur les algues du même lac. Toutefois on note que le pH des eaux de la station III est légèrement supérieure à celui des autres stations (tableau 9).

Les valeurs du pH de ces eaux sont comparables à celles du lac de soda au Kenya et du grand lac salé aux Etats Unis ou le pH de l'eau varie entre 7 et 11 (**GILMOUR, 1990**). Ces biotopes sont considérés comme étant extrêmes (**KRISTJANSSON et HERGGVIDSSON, 1995**).

La température est sensiblement la même dans toutes les stations, mais varie selon les saisons. On note un minimum hivernal de 11 °C. Dans la période estivale par contre les eaux sont assez chaudes. Le réchauffement est plus marqué dans la sebkha (station IV 35°C). Ceci est dû à un débit d'étirage très faible et à l'absence presque total de la végétation bordante, entraînant ainsi un fort échauffement des eaux comme le signale **GUIDICELLI et al, 1985**.

La conductivité est importante dans toutes les stations. Elle augmente d'un prélèvement à l'autre dans le sens (Janvier- Juin - Octobre). Elle est particulièrement élevée dans la station IV(59100µs/cm à 20 °C, ce qui correspond à une minéralisation globale de 50 g/l de sel dans le prélèvement effectué en Juin (tableau 9) . Ce résultat peut être expliqué par la remontée des sels en surface suite à l'évaporation au debut de la période sèche ..

la turbidité est variable d'une station à l'autre au cours des trois prélèvements Elle passe d'une valeur minimale (0,49 NTU/FTU) dans la station I en Octobre à une valeur maximale (38 NTU/FTU) dans la station IV en Juin. Toutefois elle est constante (16,2 NTU /FTU) dans la station III au cours des trois prélèvements. les variations observés de la turbidité des eaux est liée à la nature de la matière organique en suspension (matière minérale, algues microscopiques, limons, argiles ou débris divers) (**RODIER, 1984**).

3 . 2 . 2 - Paramètres de pollution minérale. :

la quantité d'ammoniac (NH₄) est plus importante dans les deux premières stations .surtout dans le prélèvement effectué en Juin (5,6 à 14,8 mg/l) . Elle est moins importante dans le prélèvement effectué en Janvier (0,072 à 0,12 mg/l) et presque nulle dans celui d'octobre (tableau 10).

Les teneurs en nitrites (NO₂) sont plus importantes en Janvier dans la stations IV que dans les autres stations. Par contre en Juin et en Octobre elles sont faibles (tableau 10). L'orthophosphate (PO₄) présente des valeurs nettement prononcées dans les stations I, II et III (20 mg / l) alors que dans la station IV, il n'y a que des traces. Ces concentrations diminuent durant les autres prélèvements surtout celui d'Octobre ou on note des valeurs inférieures à 0,002 mg/l d'eau (tableau 10).

Les résultats ci-dessus, indiquent l'existence d'un gradient de pollution qui diminue dans le sens station I - Station II - Station III - Station IV au cours des trois prélèvements. En effet plus on s'éloigne de la ville il y'a une dilution de la matière organique .

3 . 2 . 3 - Minéralisation globale :

Les eaux sont fortement minéralisées notamment dans le prélèvement de Juin, où on note l'abondance des ions Na⁺ et Cl⁻ en particulier dans la station IV (Na⁺ 247 700 mg/l et Cl⁻ 374000 mg/L) indiquant ainsi la forte salinité de cette station. Les ions Ca⁺⁺ sont généralement concentrés dans les trois premières stations (I , II et III) et ceci quelque soit la saison . Cependant les ions Mg⁺⁺ se répartissent équitablement dans les quatre stations au cours des trois prélèvements avec une légère augmentation de leurs teneurs dans la station IV durant le prélèvement effectué en Octobre . Cette forte concentration de Ca⁺⁺ et Mg⁺⁺ donne à la dureté totale (HT) et de la dureté temporaire (T.A.C) des valeurs élevées . Toutefois les teneurs en Ca⁺⁺ et Mg⁺⁺ enregistrées dans les quatre stations du lac restent faibles si on les compare à celles des autres lacs hypersalés (grand lac salé et la mer morte Ca⁺⁺ 16.032mg/l et Mg⁺⁺ 41.940) décrits par OREN, (1988) et GRANT (1990) . Selon **TYNDALL et al** (1980) et (1984)., la microflore de ces lacs a besoin de fortes concentrations en ces ions pour leur croissance . Les résultats obtenus en ce qui concerne les autres ions sont donnés dans le tableau 11

En résumé nous pouvons dire que les eaux du lac sont polluées et présentent un pH alcalin comparable aux pH des eaux des biotopes extrêmes (pH variant entre 8,5 et 11) . La salinité enregistrée dans la station IV est comparable à celle de la mer morte . Ce biotope peut être considéré comme étant très extrême et renfermerait donc une microflore de type extrémophile

Tableau n° 9 : paramètre physico-chimiques de quatre stations du lac d'El Goléa au cours des trois prélèvement.

Stations Paramètres	Prélèvement de Janvier				Prélèvement de Juin				Prélèvement d'Octobre			
	I	II	III	IV	I	II	II	IV	I	II	III	IV
Température (°C)	11	11 à 11.5	11	11	21	26	23	30	20	21	20	22
pH	ND	8,11	8,5	8,22	8,5	8,5	9	8,5	8,88	8,39	8,57	8,5
Conductivité (à 20°C µs/cm)	ND	1192	1127	41500	1272	3200	3040	59100	1651,4	3484,5	5255,5	6704,4
Turbidité NTU/FTU	ND	6,5	16,4	5,4	11,2	2	16,4	38	0,49	25	16,2	16,2
Résidu à sec à 105°C (mg/l)	ND	402	682	929	564	4066	1005	42020	940	1698	ND	6184,8

ND : non déterminé

Tableau n°10 - Paramètres de pollution minérale dans les quatre stations du lac d' El- Goléa (3 prélèvements)

Stations Paramètres	Prélèvement de Janvier				Prélèvement de Juin				Prélèvement d'Octobre			
	I	II	III	IV	I	II	III	IV	I	II	III	IV
Ammonium (NH ₄) mg l	ND	0,121	0,079	0,072	14,8	ND	5,6	6	Traces			
Nitrites (NO ₂) mg/l	ND	0,03	0,13	20,02	0,82	< 0,02	< 0,02	< 0,02	0,16	<0,02	<0,02	<0,02
Ortho-phosphate (PO ₄) mg l	ND	20,05	traces	20,02	21,6	< 2	2,7	< 2	0,00313	<0,002	< 0,002	<0,002
Matière oxydée en milieu acide mg/l O ₂	ND	4,37	2,94	3,64	8,97	11,7	4,91	7,76	0,96	7,04	7,84	ND

ND : non déterminé

Tableau N° 11 : - Dosages des sels minéraux des quatre stations du lac au cours des trois prélèvements.

Stations éléments minéraux	Prélèvement de Janvier				Prélèvement de Juin				Prélèvement d'Octobre			
	I	II	III	IV	I	II	III	IV	I	II	III	IV
Ca ⁺⁺ (mg/l)	ND	55,15	47,73	23,98	75	24,2	48,4	57	105,04	76,7	91,1	60,3
Mg ⁺⁺ (mg/l)	ND	28,77	29,03	14,78	1,8	114,7	59,04	ND	38,4	57,12	44,4	269,5
Na ⁺ (mg/l)	ND	159,25	157,25	8590	895,5	1660	2625	247700	219,5	410,5	415	1945
K ⁺ (mg/l)	ND	31,75	27,25	65	32	73,4	63,2	ND	45,5	72,5	77,4	244
Cl ⁻ (mg/l)	ND	185,22	172,95	1449,14	188	674,2	578,7	374000	287,5	548,5	587	310645
SO ₄ ⁻ (mg/l)	ND	210	173,5	405	418	ND	599	394,4	207,5	190,6	243,7	170,9
HCO ₃ ⁻ (mg/l)	ND	364,17	109,5	88,44	ND	ND	ND	ND	235,46	163,4	139,08	136,64
Dureté total TH en mg/l Ca	ND	94,6	88,2	44,6	ND	ND	ND	ND	168	171,2	164,2	104,72
Titre acidométrique complet (T.A.C mg/l Ca)	ND	39,4	36	29	152	130	120	105,2	77,2	53,6	76	44,8

ND : non déterminé

Tableau 12: Minéralisation globale des quatre stations par rapport à la conductivité au cours des trois prélèvements

Stations Paramètres	Prélèvement de Janvier				Prélèvement de Juin				Prélèvement d'Octobre			
	I	II	II	IV	I	II	III	IV	I	II	III	IV
Conductivité à 20 °C (µs/cm)	ND	1192	1127	41500	1272	3200	3040	59100	1651,4	3484,5	5255.5	6704,4
Coefficient correspondant	ND	0,758544	0,758544	0,850432	0,758544	0,7858544	0,758544	0,850432	0,758544	0,758544	0,758544	0,758544
Minéralisation globale (g/l)	ND	0,90418	0,85487	35,2928	0,96486	2,4273	2,30597	50,2605	1.2526	2,6431	3,9869	5.0855

ND : non déterminé

3.3 - Analyses microbiologiques :

3.3.1 - Dénombrement de la flore fongique:

Les résultats des dénombrements de la flore fongique dans les trois prélèvements sont représentés dans les figures 3, 4 et 5 .

D'une manière générale on note que les dénombrements effectués au cours des trois prélèvements font ressortir que le nombre de champignons diminue dans le sens Octobre -Janvier- Juin.

3.3.1.1 - Prélèvement effectué en Janvier (figure 3) :

On remarque que le nombre de colonies est variable selon les stations et les concentrations de NaCl utilisées lors de l'isolement (T et 3%) ; Le nombre de champignons est plus élevé dans les stations I et II (25 germes /ml) par rapport aux stations III et IV. Au delà de 10% de NaCl, les stations III et IV présentent un nombre élevé de germes (7 germes/ml). Ceci peut être expliqué par une éventuelle adaptation des souches à la salinité.

3.3.1.2 - Prélèvement effectué en Juin (figure 4) :

Le nombre de germes est important à partir de 10% de NaCl (10 germes / ml) puis diminue à 25% de NaCl (3 germes) et s'annule à 30% de NaCl.

Dans la station IV, ce nombre est très faible (04 germes / ml) a cause de la forte salinité de cette station .

3.3.1.3 - Prélèvement effectué en Octobre (figure 5) :

Les champignons sont en nombre plus élevé à 20% de NaCl (16 germes / ml) par rapport aux 2 autres prélèvements. Il y aurait un bon développement des champignons extrémophiles. Après la saison sèche (été) certains souches ce sont ainsi adaptées aux fortes concentrations en sel due à l'évaporation de l'eau .

3.3.2 - Isolement des souches :

Les souches de champignons ayant poussé, 437 souches au totale ont été isolées . Ces souches ont été numérotées de la façon suivante :

Le premier chiffre indique la station (I , II , III ou IV).

N_x représente la concentration en NaCl utilisée ($N_0 = 0\%$, $N_1 = 3\%$, $N_2 = 10\%$, $N_3 = 20\%$, $N_4 = 25\%$ et $N_5 = 30\%$ de NaCl)

Les chiffres 100, 200 et 300 représentent le numéro d'ordre de la souche

3.3.3 - Identification des souches :

Les résultats de l'identification sont consignés dans le tableau N° 13.

Parmi les 437 souches retenues, 89 n'ont pu être étudiées et identifiées pour des raisons techniques . Le reste des souches au nombre de 348 ont été étudiées .Elles sont caractérisées par l'absence de cellules mobiles, elles font donc partie de la division III (Amastigomycota).

3.3.3.1 - Détermination de la classe :

Parmi les 348 souches , 313 se caractérisent par un mycélium cloisonné , l'absence d'ascospores et basidiospores . La reproduction se fait au moyen de conidies. Elles sont donc incluses dans la classe des **Deutéromycètes** .

Les 35 autres souches produisent un mycélium non cloisonné et se reproduisent de façon asexuée par sporocystospores . Elles appartiennent donc à la classe des **zygomycètes**. De plus les spores de ces souches sont contenues dans des sporocystes, on peut donc les rattacher à l'ordre des **Mucorales**.

3.3.3.2 - Détermination des genres des classes de Deutéromycètes et de Zygomycètes .

Selon la couleur du thalle, la forme et la disposition des cellules conidiogènes (phyalides), la nature et l'étude microscopique des organes différenciés (apothécies, pycnides et sporodochies) ; et la morphologie des conidies, on peut rattacher 145 souches au genre *Aspergillus*, car elles présentent un thalle cloisonné portant de nombreux conidiophores, dressés, non ramifiés, terminés en vésicules ; des conidies globuleuses ou elliptiques, en chaîne divergentes ou associées en colonnes compactes (figure 6 à 11) .

93 souches présentent un thalle blanc ouvert, conidiophores groupés en faisceaux lâches ou agrégés, en corémies, des pénicilles mono, bi ou triverticillées, phialides amphiliiformes et des conidies disposées en chaîne ; elles sont soit globuleuses, elliptiques ou cylindriques. Lisses ou rugueuses. Elles font partie du genre *Penicillium*.

19 souches possèdent un thalle blanc, rose ou violet ; des conidiophores ramifiés, formant des sporodochies, produisent des macroconidies et des microconidies fusiformes ou ovoïdes, rares ou abondantes, elles s'apparentent au genre *Fusarium*. (figure 14-15)

15 souches se caractérisent par un thalle de couleur noire, des conidiophores à croissance sympoïdes ; conidies bourgeonnées à travers la paroi du conidiophore, en chaînes acropétales, noir en forme de massue cloisonnées longitudinalement et transversalement. Elles s'identifient au genre *Alternaria*.(figure 19)

12 souches ont un thalle jaune verdâtre. Les conidies sont lisses et sphériques , groupées en amas . Elles sont apparentées au genre *Trichoderma*,

07 souches présentent un thalle clair à croissance rapide, hyphes larges septées à paroi épaisse, des conidiophores non différenciés et des arthrospores renflées, présentant entre elles un filament protoplasmique. Elles font donc partie du genre *Crysonilia*.

04 souches se distinguent par un thalle de couleur olivacé, velouté, conidiophores droits, des conidies en chaînes acropétales, les inférieures sont plus grandes et septées, les autres unicellulaires, on peut les rattacher au genre *Cladosporium*.

02 souches possèdent un thalle visqueux, pâle puis noir, des conidies unicellulaire, bourgeonnées, en groupes sur de courtes ramifications (hyphes), elles s'apparentent au genre *Aureobasidium*. (figure 16)

04 souches présentent un thalle floconneux, de couleur blanc grisâtre, puis brun, des microphialides subulées, microconidies ovales, ressemble à un *Fusarium*, mais se rattache au genre *Cylindrocarpon*. (figure 17)

03 souches ont thalle étroit et clair, des pores unicellulaires latérales, ou intercalaires, à paroi épaisse, elle se rapproche du genre *Crysosporium*.

09 souches se caractérisent par un thalle hyalin, puis gris à brun noir, avec des cellules hyalines, des conidies grosses, globuleuses et lisse, des phialides rares, appartient donc au genre *Humicola*. (figure 18)

35 souches ont un thalle blanc grisâtre, sporocytophores ramifiés vers le haut, formés sur des stolons avec Rhizoïdes, sporocystes globuleux, noirs, multispores et des spores sub-globuleuses ; les souches sont apparentées au genre *Rhizomucor*.

3 . 3 . 3 . 3 - Détermination des espèces du genre *Aspergillus*: (figure 6 -11)

Les 145 souches apparentées au genre *Aspergillus* ont été rattachées aux espèces suivantes :

Aspergillus niger (25 souches), *Aspergillus terreus*(20 souches), *Aspergillus sidowi* (19 souches), *Aspergillus repens* (18 souches),*Aspergillus ochraceus* (17 souches), *Aspergillus fumigatus* (16 souches), *Aspergillus flavus* (13 souches), *Aspergillus candidus* (5 souches) et *aspergillus wentii* (3 souches). Les 9 autres n'ont pu être déterminées .Parmis elles 6 sont identiques entre elles et appartiennent à la même espèce *Aspergillus . sp₁*, les 3 autres identiques entre elles appartiennent à la même espèce *Aspergillus . sp₂*

3 . 3 . 3 . 4- Détermination des especes du genre *Penicillium* : (figure 12-13)

80 souches de *Penicillium* ont été rattachées aux espèces suivantes

Penicillium dupontii (23 souches) , *Penicillium chrysogenum* (14 souches), *Penicillium expansum* (11 souches), *Penicillium digitatum* (16 souches), *Penicillium lelacinum* (10 souches) , *Penicillium italicum* (6 souches).

Les 13 autres souches n'ont pu être rattachées de façon précise aux espèces connues . Elle ont été regroupées selon leur ressemblances en :

Penicillium sp₁ (4 souches) , *Penicillium sp₂* (4 souches) , *Penicillium sp₃* (6 souches) et *Penicillium sp₄* (2 souches)

3.3.3.5 - Détermination de l'espèce du genre *Fusarium* :

19 souches ont été rattachées au genre *Fusarium*. Six d'entre elles se caractérisent par des canidiophores courts, des microconidies ovoïdes, macroconidies fusiformes, plus ou moins courbées aux deux extrémités. Elles ont été rattachées à l'espèce *Fusarium oxysporum* (figure 14).

Les 13 autres souches présentent un thalle violacé, des microconidies fusiformes, unicellulaires ou uniseptées, macroconidies allongées en fuseau, 3-7 septées. Elles s'identifient à l'espèce *Fusarium moniliforme*. (figure 15).

3.4 - Détermination de l'optimum de croissance des souches :

3.4.1 - Détermination de l'optimum de température de croissance :

Selon la classification de EVANS (1971), les champignons testés ont été classés de la manière suivante (tableau 14) :

- **Thermotolerants** : 7 souches, il s'agit de IVN₃ 304 (*Penicillium sp.*₃), IVN₃ 308 (*Aspergillus terreus*), IN₄ 221 (*Aspergillus.sp.*₁), IIN₀ 240 (*Aspergillus.sp.*₂), IVN₃ 301 (*Cladosporium.sp.*), IIN₃ 306 (*Aspergillus niger*) et IVN₂ 307 (*penicillium digitatum*).

- **Thermophiles modérés** : 5 souches: IIN₃ 319 (*Rhizomucor .sp.*), IIN₄ 213 (*Aspergillus flavus*), IN₃ 101 (*Aspergillus fumigatus*), IIN₄ 216 (*Aspergillus ochraceus*) et IIN₀ 290 (*Aspergillus wentii*).

- **Thermophiles strictes**: Toutefois, la souche IVN₄ 223 (*Penicillium dupontii*) pousse bien à 45 et 55°C. EL FASSI et al., 1994 classe *Penicillium dupontii* comme étant thermophile modéré parce que sa température maximale de croissance est de 55 °C et minimale de 20 °C..

3.4.2 - Détermination de l'optimum de salinité pour la croissance des souches :

Selon la classification de KUSHNER, (1978), les champignons testés ont été classés de la manière suivante (tableau 15): :

- **Halotolérants** : 11 souches: IN₂ 361 (*Penicillium lelacinum*), IN₃ 256 (*Penicillium italicum*), IIN₃ 203 (*Penicillium .sp.*₄), IVN₃ 333 (*Penicillium chrisogenum*), IN₄ 221 (*Aspergillus .sp.*₁), IVN₄ 262 (*Penicillium expansum*), IN₄ 119 (*Penicillium sp.*₁), IVN₄ 118 (*Aspergillus sidowi*), IIN₃ 306 (*Aspergillus niger*), IIN₃ 309 (*Fusarium moniliforme*) et IN₃ 101 (*Aspergillus fumigatus*).

- **Halophiles modérés** : 5 souches, il s'agit de: IVN₃ 304 (*Penicillium.sp.*₃), IIN₀ 240 (*Aspergillus.sp.*₂), *Penicillium Sp.*₁, *Aspergillus sidowi* et *Aspergillus ochraceus*.

- **Halophiles extrêmes** : 2 souches II N₄ 120 apparenté à *Aspergillus. repens* et III N₃ 238 rattachées à *Penicillium .sp.*₂. Elle présentent un optimum de croissance à des concentrations de NaCl entre 15 % et 30 %. L'espèce *Aspergillus repens* a été isolée à partir de saumure de viande de poisson par PITT et al., (1988). De leur côté ZIDAN et ABDELMALEK, (1981) indiquent que l'aptitude de *Aspergillus. niger*, *Aspergillus. ochraceus* et *Aspergillus. tamaritii* à pousser sur milieux salés est due à l'accumulation interne du glycérol. (figure 21-22)

Tableau 13 : Identification des souches :

Espèce	Numéro des souches	Nombre total
<i>Aspergillus niger</i>	IIIN ₃ 306, IN ₄ 306, IIN ₃ 306, IIN ₃ 225, IN ₃ 225, IVN ₃ 225, IIN ₂ 373, IN ₀ 373, IIN ₀ 116, IIN ₀ 108, IVN ₃ 108, IIN ₃ 108, IIN ₃ 110, IIN ₃ 110, IVN ₃ 110, IN ₃ 367, IIN ₃ 367, IVN ₄ 367, IN ₀ 395, IIN ₃ 395, IIN ₂ 295, IVN ₄ 123, IIN ₃ 123, IN ₄ 123, IIN ₃ 123.	25
<i>Aspergillus terreus</i>	IVN ₃ 308, IN ₄ 308, IIN ₃ 308, IVN ₄ 206, IIN ₄ 206, IIN ₃ 206, IN ₄ 206, IIN ₃ 207, IVN ₂ 207, IVN ₃ 313, IIN ₃ 313, IVN ₃ 115, IN ₃ 367, IIN ₃ 115, IN ₃ 115, IIN ₄ 215, IVN ₃ 215, IVN ₄ 223, IIN ₃ 223, IVN ₅ 224, IIN ₅ 224	20
<i>Aspergillus sidowi</i>	IVN ₄ 118, IN ₄ 118, IIN ₄ 118, IN ₄ 118, IVN ₃ 134, IIN ₃ 134, IN ₄ 134, IVN ₃ 334, IIN ₃ 334, IVN ₄ 205, IIN ₃ 205, IIN ₃ 205, IN ₃ 367, IN ₄ 205, IIN ₃ 107, IVN ₃ 107, IIN ₁ 107, IIN ₃ 210, IVN ₃ 210, IIN ₄ 210.	19
<i>Aspergillus repens</i>	IVN ₄ 120, IIN ₄ 120, IIN ₄ 120, IIN ₄ 312, IVN ₄ 312, IIN ₅ 112, IVN ₄ 112, IIN ₅ 113, IVN ₄ 113, IIN ₄ 113, IIN ₄ 112, IVN ₃ 377, IIN ₃ 377, IVN ₃ 251, IIN ₄ 251, IVN ₃ 286, IIN ₅ 286.	18
<i>Aspergillus ochraceus</i>	IIN ₄ 216, IVN ₄ 216, IIN ₃ 299, IIN ₄ 299, IVN ₂ 299, IIN ₂ 150, IVN ₄ 150, IIN ₃ 317, IVN ₄ 317, IIN ₄ 317, IVN ₀ 199, IIN ₃ 199, IVN ₂ 399, IVN ₀ 372, IVN ₃ 281, IVN ₄₂ 111, IVN ₁ 181.	17
<i>Aspergillus fumigatus</i>	IN ₃ 101, IIN ₄ 101, IIN ₃ 101, IIN ₃ 194, IIN ₅ 194, IN ₂ 161, IVN ₃ 161, IIN ₃ 161, IIN ₃ 161, IIN ₃ 209, IIN ₂ 209, IN ₄ 209, IIN ₀ 394, IIN ₂ 279, IIN ₀ 394, IIN ₃ 279, IN ₃ 279.	16
<i>Aspergillus flavus</i>	IIN ₄ 213, IIN ₃ 213, IVN ₃ 213, IN ₃ 345, IIN ₃ 345, IIN ₄ 345, IVN ₀ 170, IIN ₃ 170, IN ₄ 170, IN ₃ 252, IIN ₂ 252, IVN ₂ 252, IIN ₄ 252.	13
<i>Aspergillus candidus</i>	IVN ₃ 235, IIN ₂ 235, IN ₂ 235, IIN ₂ 217, IIN ₂ 124.	05
<i>Aspergillus wentii</i>	IIN ₀ 290, IIN ₀ 328, IIN ₀ 126.	03
<i>Aspergillus sp₁</i>	IN ₄ 221, IIN ₃ 115, IIN ₃ 105, IIN ₂ 149, IIN ₃ 301, IVN ₄ 219.	06
<i>Aspergillus sp₂</i>	IIN ₀ 240, IVN ₃ 303, IVN ₂ 214.	03
<i>Penicillium dupontii</i>	IVN ₄ 223, IIN ₁ 311, IIN ₀ 223, IVN ₂ 311, IIN ₃ 223, IIN ₄ 109, IN ₃ 109, IVN ₂ 109, IIN ₀ 311, IVN ₃ 231, IIN ₃ 231, IVN ₄ 125, IVN ₃ 320, IIN ₃ 320, IIN ₀ 320, IN ₀ 320, IIN ₀ 126, IIN ₂ 137, IVN ₃ 137, IN ₀ 137, IVN ₃ 126, IIN ₂ 137, IIN ₃ 126.	23
<i>Penicillium chrysogenum</i>	IVN ₃ 333, IIN ₃ 333, IN ₀ 333, IIN ₁ 381, IIN ₃ 157, IVN ₂ 157, IN ₄ 157, IIN ₀ 375, IVN ₃ 375, IIN ₃ 267, IIN ₃ 269, IVN ₄ 267, IIN ₂ 269, IVN ₃ 269.	14

<i>Penicillium expansum</i>	IVN ₄ 262, IIN ₂ 262, IN ₃ 262, IN ₄ 262, IN ₁ 380, IVN ₃ 380, IIN ₀ 127, IN ₃ 216, IVN ₂ 216, IVN ₀ 216, IIN ₄ 127.	11
<i>Penicillium digitatum</i>	IVN ₂ 307, IIN ₃ 307, IN ₃ 307, IN ₂ 271, IVN ₃ 271, IN ₃ 129, IIN ₄ 129, IIN ₂ 129, IN ₀ 339, IIN ₂ 339, IVN ₃ 339, IN ₁ 340, IVN ₄ 340, IIN ₄ 340, IN ₃ 329, IVN ₃ 399..	16
<i>Penicillium lelacinum</i>	IN ₂ 361, IIN ₃ 361, IIN ₃ 361, IN ₁ 295, IIN ₃ 295, IVN ₃ 228, IIN ₂ 228, IN ₀ 228, IIN ₁ 228, IIN ₂ 310.	10
<i>Penicillium italicum</i>	IN ₃ 256, IIN ₂ 256, IIN ₃ 256, IVN ₃ 193, IIN ₀ 292, IN ₀ 292.	06
<i>Penicillium sp1</i>	IIN ₄ 119, IIN ₄ 119, IVN ₄ 119.	03
<i>Penicillium sp2</i>	IIN ₄ 234, IVN ₃ 251, IVN ₃ 238, IVN ₄ 239.	04
<i>Penicillium sp3</i>	IVN ₃ 304, IIN ₃ 305, IVN ₄ 248, IVN ₃ 202	04
<i>Penicillium sp4</i>	IIN ₃ 203, IIN ₃ 105.	02
<i>Fusarium moniliforme</i>	IIN ₃ 309, IN ₃ 309, IIN ₃ 309, IVN ₁ 309, IIN ₃ 173, IVN ₂ 310, IN ₃ 316, IIN ₃ 325, IVN ₂ 325, IIN ₃ 325, IIN ₀ 189, IIN ₃ 189, IIN ₀ 344.	13
<i>Fusarium oxysporum</i>	IN ₂ 313, IVN ₁ 313, IIN ₂ 128, IIN ₃ 128, IIN ₁ 227, IN ₃ 227.	06
<i>Rhizomucor sp</i>	IVN ₂ 204, IIN ₀ 320406, IN ₃ 204, IIN ₁ 218, IVN ₃ 218, IIN ₀ 226, IIN ₀ 226, IVN ₃ 226, IN ₄ 226, IIN ₂ 393, IVN ₄ 393, IIN ₀ 393, IN ₁ 100, IIN ₁ 100, IIN ₂ 100, IVN ₃ 100, IN ₀ 111, IIN ₂ 111, IVN ₀ 111, IN ₃ 389, IVN ₁ 389, IN ₂ 211, IIN ₄ 211, IIN ₃ 211, IN ₀ 349, IIN ₃ 319, IN ₀ 319, IIN ₃ 319, IVN ₁ 319, IIN ₂ 200, IIN ₀ 337, IN ₂ 337, IIN ₁ 372, IN ₀ 372, IIN ₂ 372.	35
<i>Alternaria sp</i>	IVN ₂ 141, IIN ₂ 141, IN ₁ 141, IIN ₀ 141, IVN ₁ 289, IN ₀ 289, IN ₂ 244, IIN ₀ 244, IIN ₀ 244, IN ₀ 327, IIN ₂ 327, IN ₂ 326, IIN ₂ 326, IIN ₀ 326, IIN ₀ 289.	15
<i>Tricoderma sp</i>	IVN ₂ 253, IIN ₂ 253, IN ₃ 253, IIN ₀ 253, IN ₀ 229, IIN ₀ 229, IIN ₂ 2300, IN ₂ 300, IIN ₀ 300, IIN ₀ 273, IN ₂ 273, IIN ₀ 273.	12
<i>Humicola sp</i>	IN ₃ 302, IIN ₃ 302, IIN ₃ 302, IVN ₀ 302, IIN ₃ 225, IN ₃ 225, IIN ₂ 373, IN ₄ 373, IIN ₃ .	09
<i>Crysonilia sp</i>	IN ₂ 318, IIN ₀ 318, IIN ₀ 318, IIN ₀ 237, IN ₂ 237, IIN ₂ 237, IN ₂ .	07
<i>Cladosporium sp</i>	IVN ₃ 301, IIN ₃ 301, IIN ₂ 301, IN ₂ 301.	04
<i>Cylindrocarpon sp</i>	IIN ₀ 315, IN ₁ 315, IIN ₁ 372, IN ₀ 372.	04
<i>Crysosporium sp</i>	IIN ₀ 314, IIN ₀ 314, IN ₀ 314.	03
<i>Aureobasidium sp</i>	IN ₀ 326, IIN ₀ 326.	02

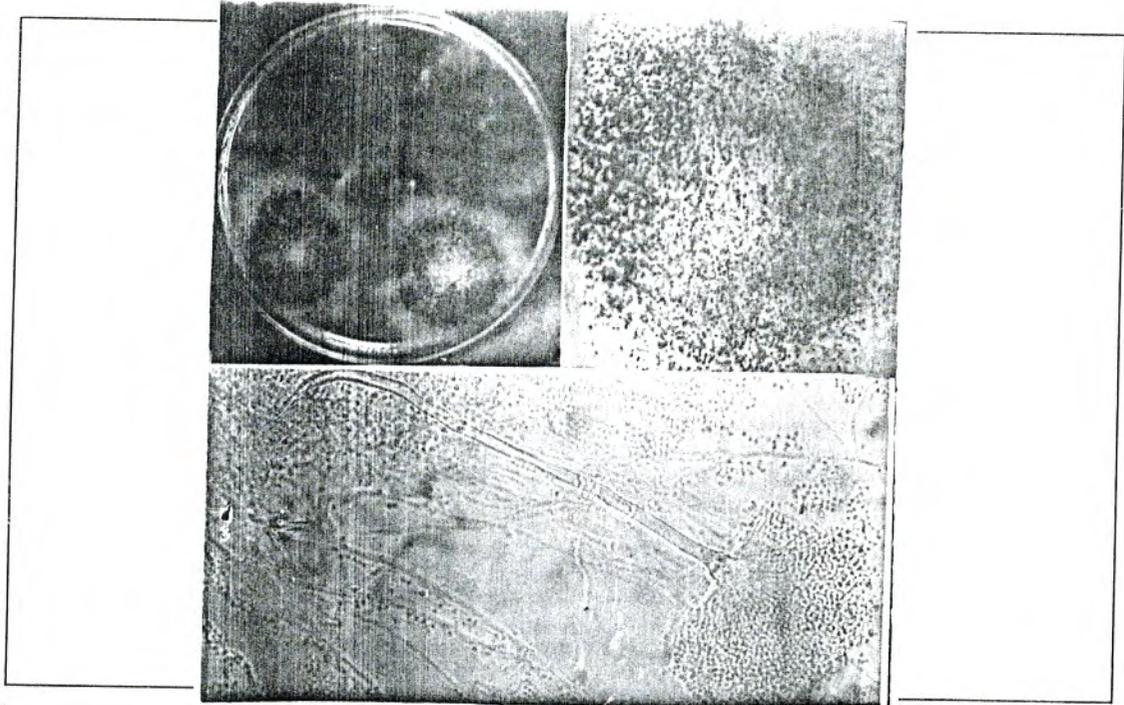


Figure 6 : La souche II No 290 apparentée à *Aspergillus Wentii* cultivé sur milieu G25N

a), b) : Aspect macroscopique

c) : Aspect microscopique représentant les conidies GX 200

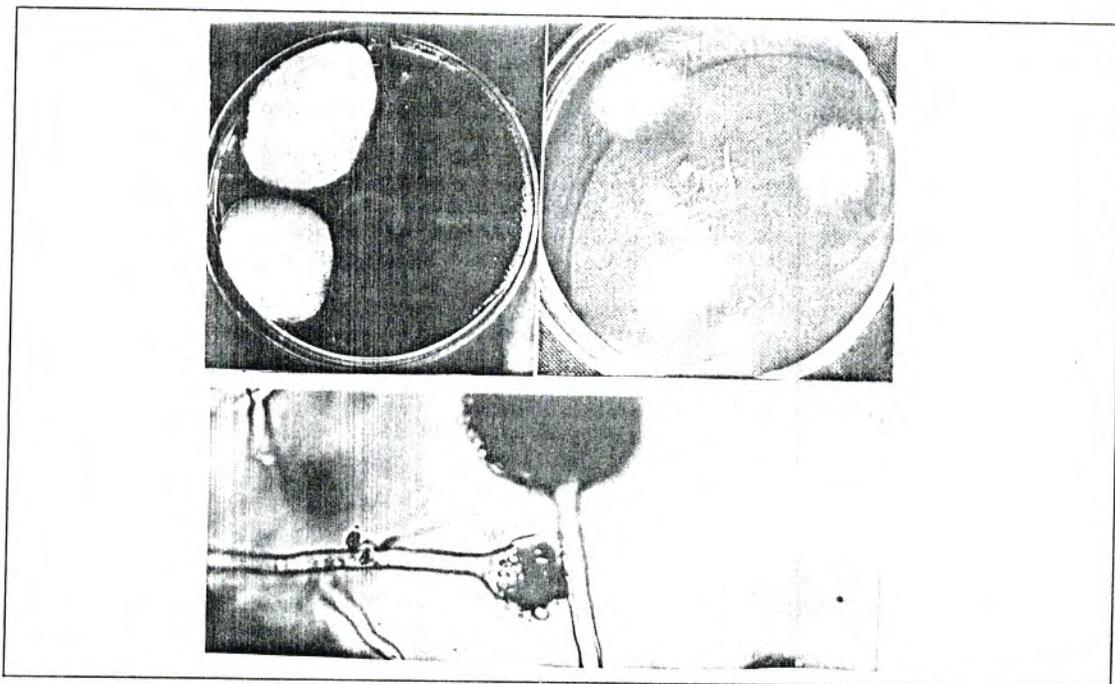


Figure 7 : La souche IV N₃ 308 apprennée à *Aspegillus terreus* cultivé sur milieu G25N

a),b) : Aspect Macroscopique

c) , Aspect microscopique représentant les conidies GX 400

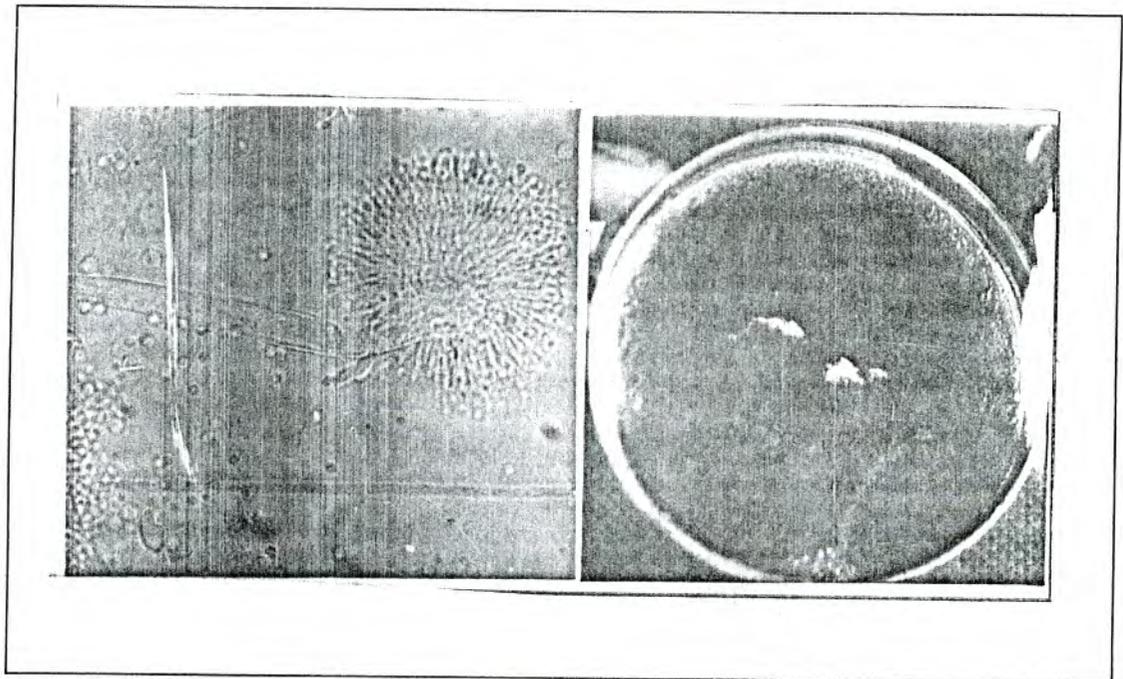


Figure 8 : La souche III N₃ 308 apparentée à *Aspergillus niger* cultivé sur milieu G25N

- a) : Aspect macroscopique
- b) : Aspect microscopique représentant les conidies GX 400

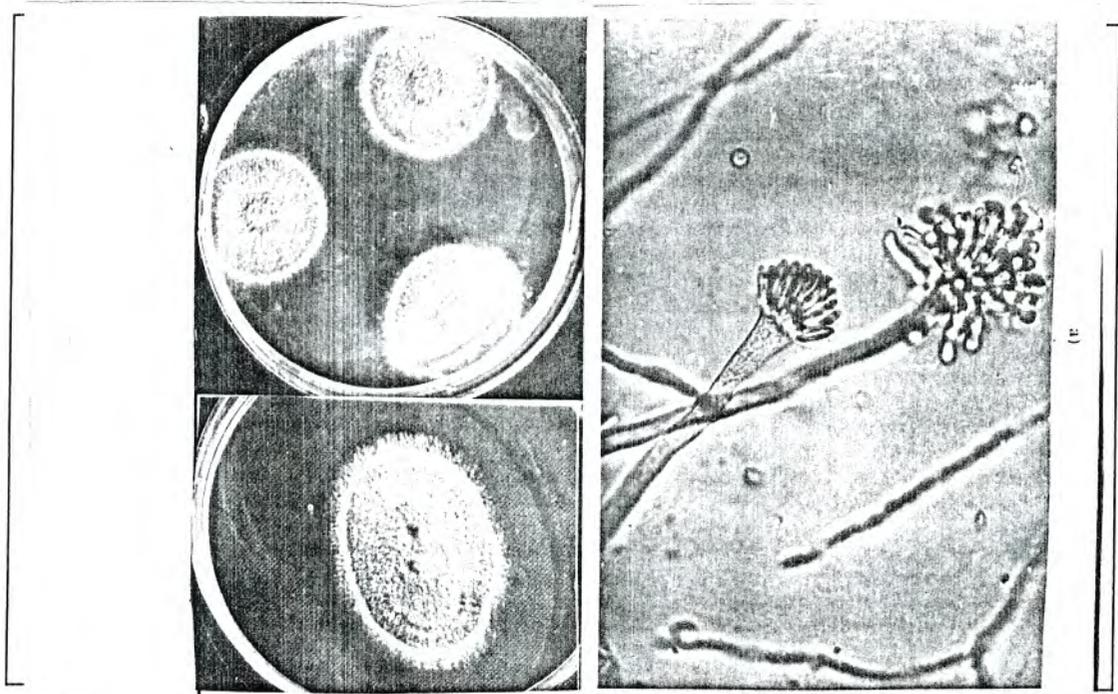


Figure 9 : La souche III N₄ 213 apparentée à *Aspergillus flavus* cultivé sur milieu G25N

- a) : Aspect microscopique
- b), c) : Aspect Macroscopique représentant les conidies

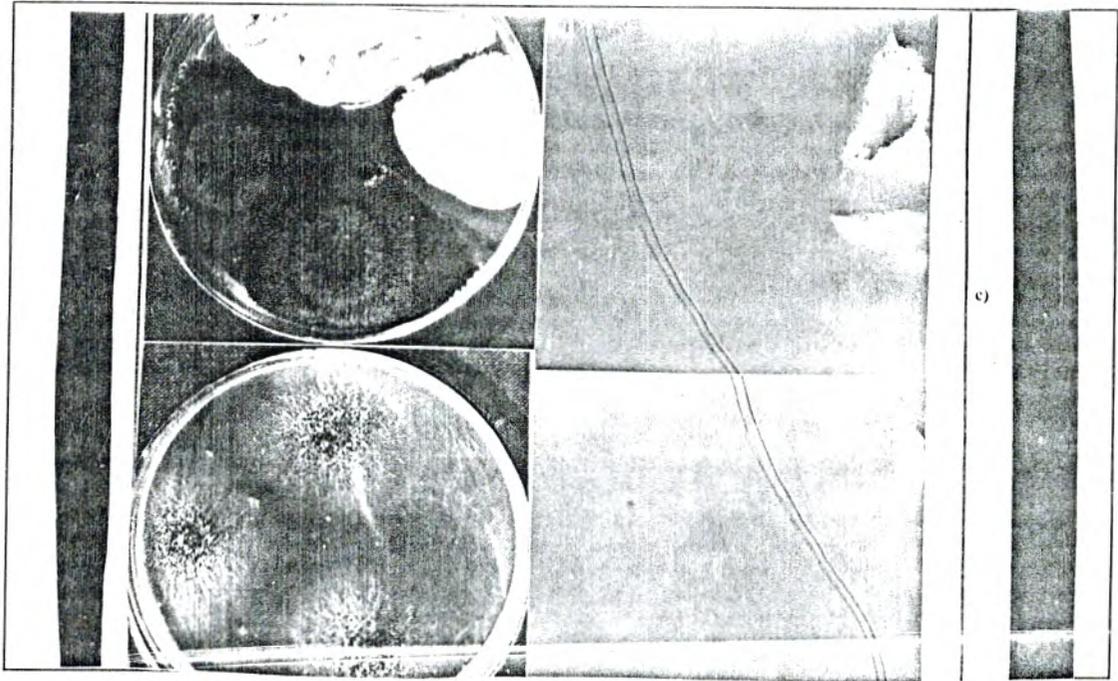


Figure 10 : La souche IV N₃ 235 apparentée à *Aspergillus candidus* cultivé sur milieu G25N

a), b) : Aspect macroscopique

c) : Aspect microscopique représentant les conidies GX 400

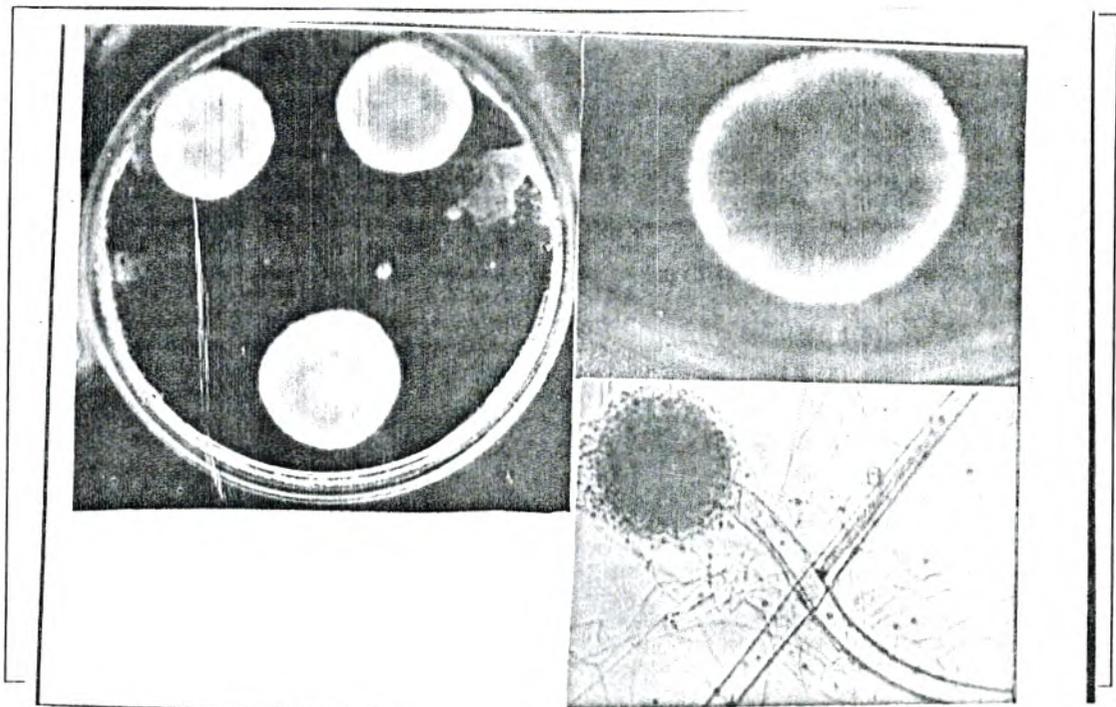


Figure 11 : La souche III N₄ 216 apparentée à *Aspergillus ochraceus* cultivé sur milieu G25N

a), b) : Aspect Macroscopique

c) : Aspect microscopique représentant les conidies GX 200

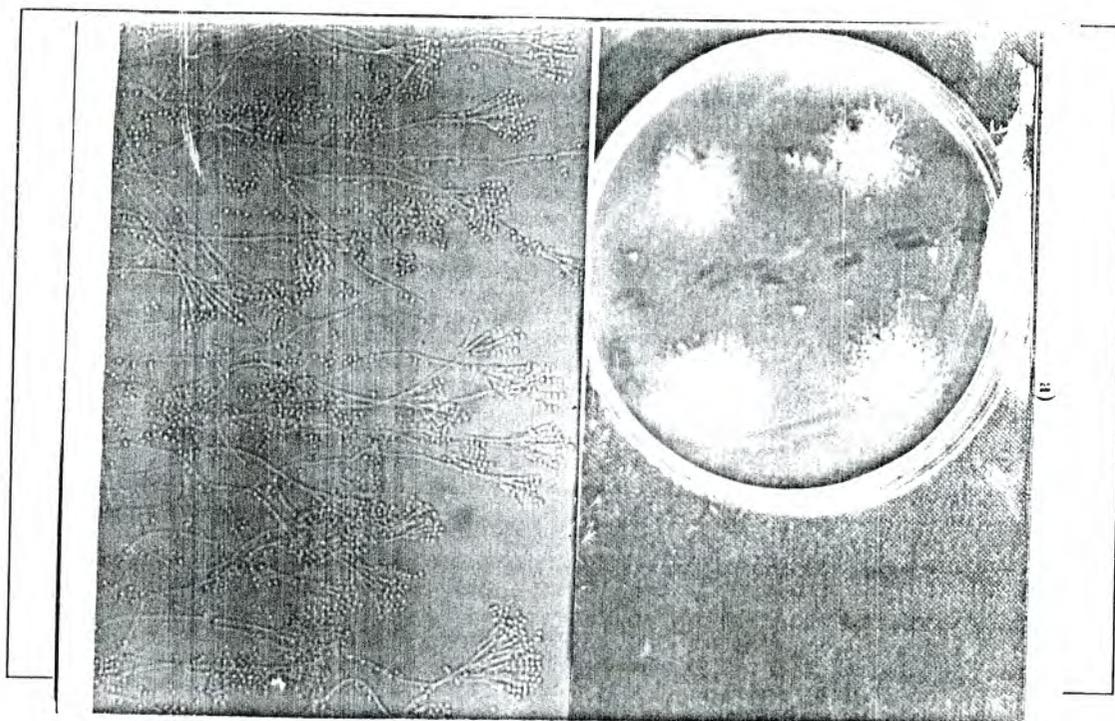


Figure 12 : La souche IV N₄ 262 apparentée à *Penicillium expansum* cultivé sur milieu G25N

a), b) : Aspect macroscopique

c) : Aspect microscopique représentant les conidies GX 400

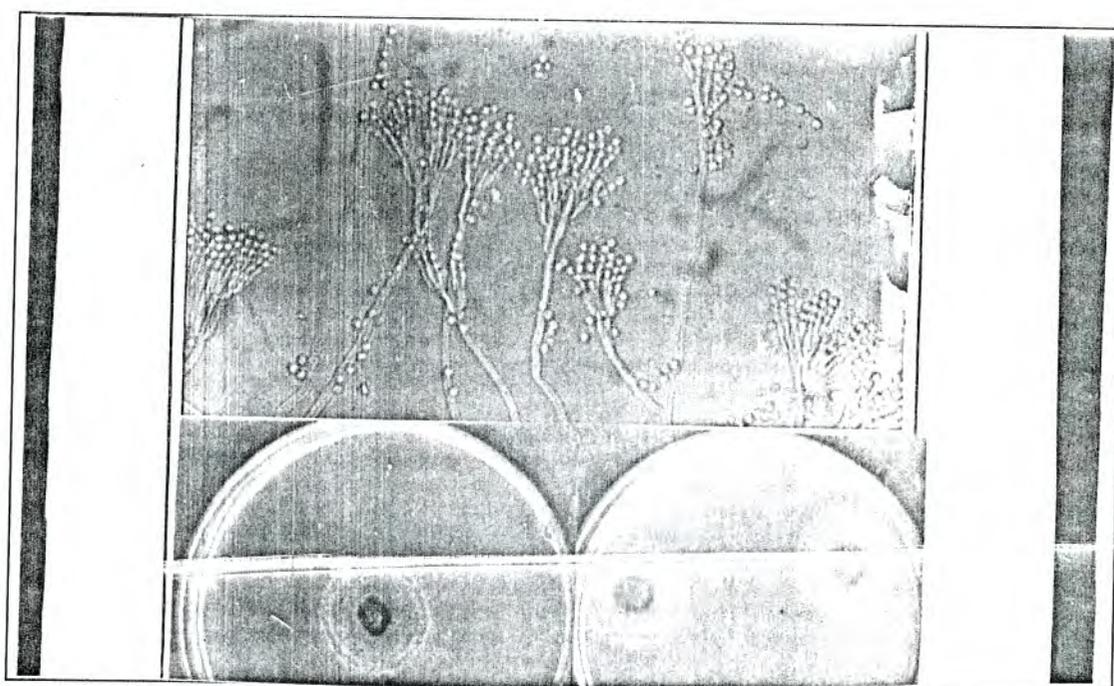


Figure 13 : La souche IV N₃ 333 apparentée à *Penicillium chrysogenum* cultivé sur milieu G25N

a) : Aspect Macroscopique

b) : Aspect microscopique représentant les conidies GX 630

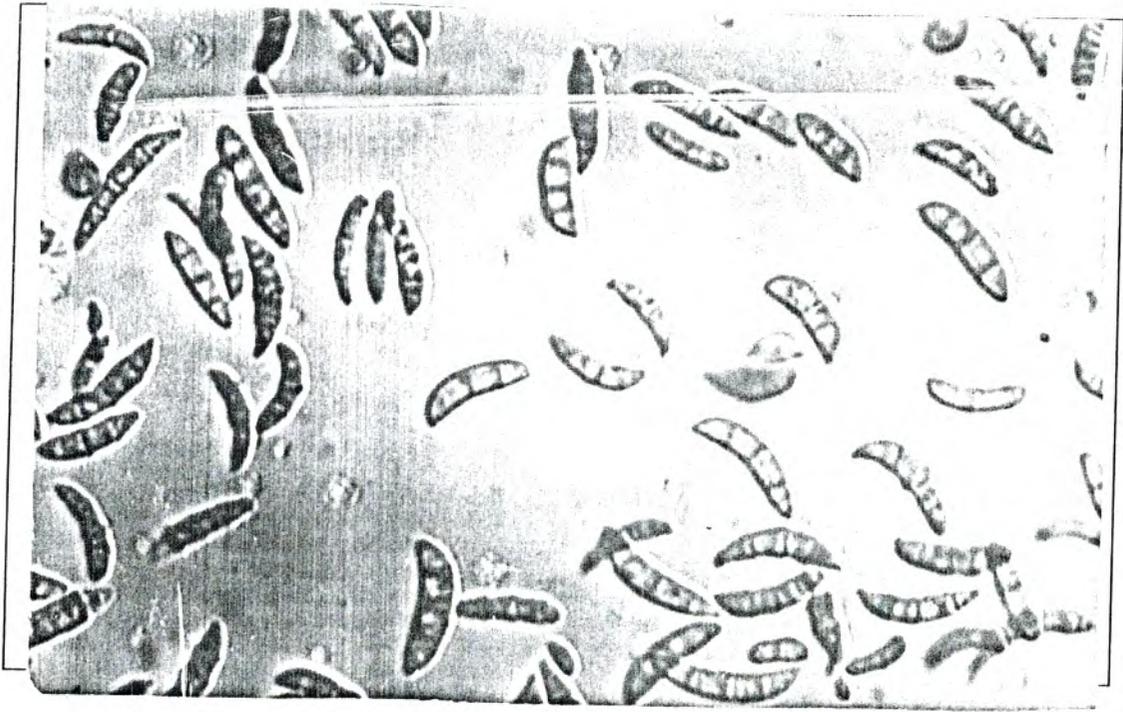


Figure 14 : Microconidies abondantes, macroconidies de la souche I N₂ 213 apparentée à *Fusarium oxysporum* GX 400



Figure 15 : Macroconidies en fuseau allongées (3-7 septées) de la souche III N₃ 309 apparentée à *Fusarium moniniforme* GX 400

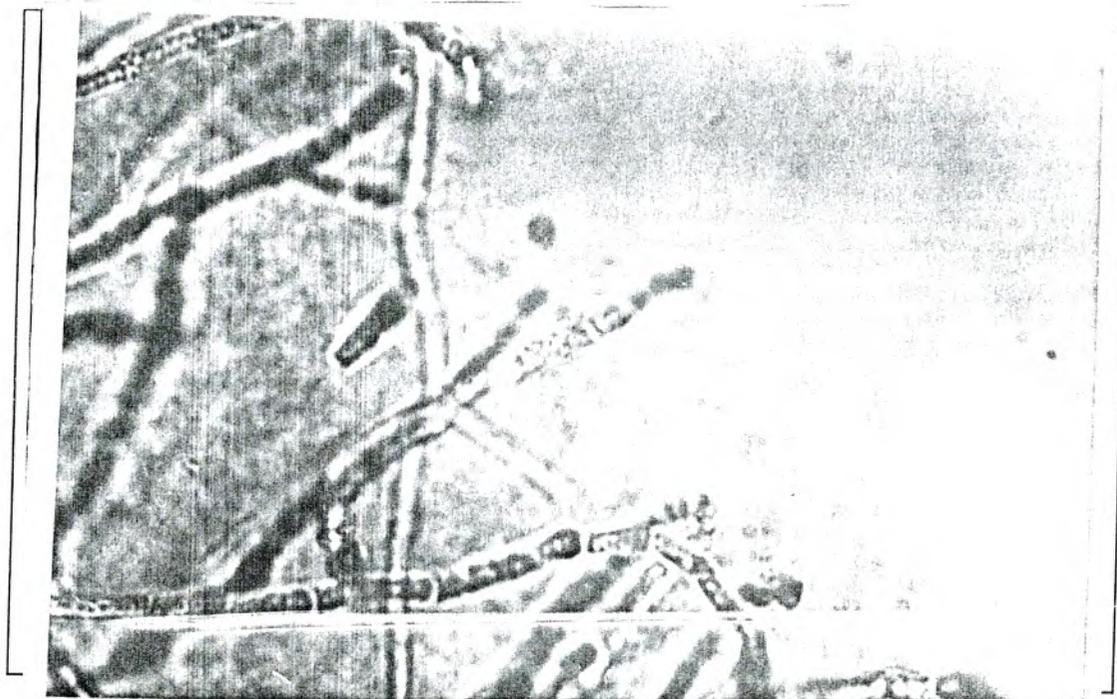


Figure 16 : Mycelium (vue d'ensemble) de la souche I N₀ 326 apparentée au genre *Auréobasidium* GX 400

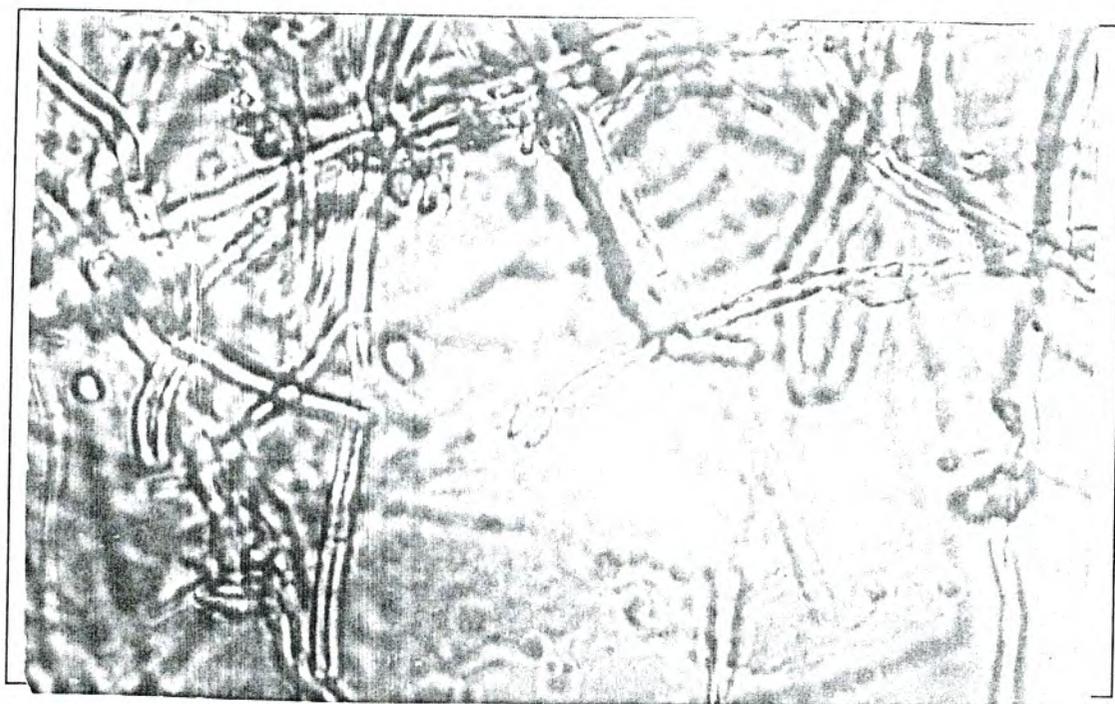


Figure 17 : Phialides solitaires portant des conidies (réunies en glomérules) de la souche II N₀ 315 apparentée au genre *Cyllindrocarpon* GX 400



Figure 18 : La souche I N₃ 302 apparentée au genre
Humicola GX 400

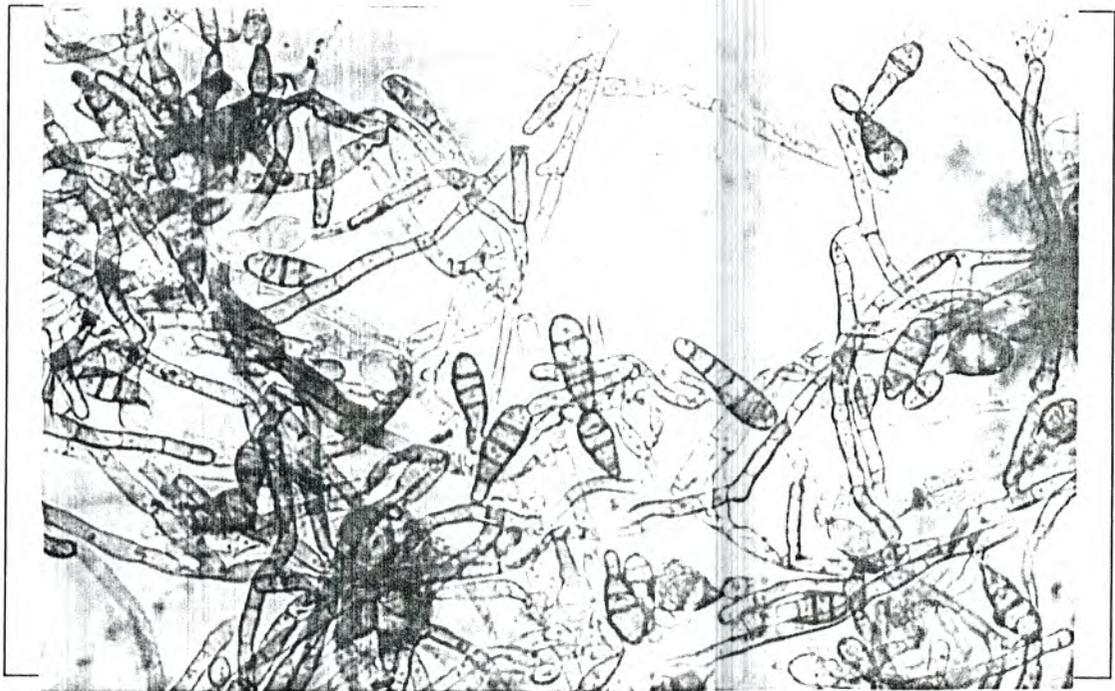


Figure 19 : La souche III N₂ 141 apparentée au genre
Alternaria GX 400

Tableau 14 : Optimums de température des souches isolées à 45 °C.

Souches	Température en °C						Optimum de température (°C)	Classification
	20	25	30	35	45	55		
IV N ₃ 202	+	++	+++	+	+	-	30	Thermotolérant
IV N ₂ 204	+	+	++	+++	++	+	35	Thermophile modéré
IV N ₃ 308	+	++	++	+++	+	-	35	Thermotolérant
III N ₄ 213	+	+	+	++	+++	+	45	Thermophile modéré
IV N ₄ 219	+	++	+++	+	+	-	30	Thermotolérant
IV N ₄ 223	+	+	+	++	+++	++	45	Thermophile stricte
I N ₃ 101	+	+	+	++	+++	+	45	Thermophile modéré
III N ₃ 301	+	++	+++	+	+	-	30	Thermotolérant
III N ₃ 306	+	+	++	+++	+	-	35	Thermotolérant
III N ₃ 307	+	++	+++	+	+	-	30	Thermotolérant
IV N ₄ 220	+	+	++	+++	+	+	35	Thermophile modéré
SM2	+	+	+	+++	+++	+	40	Thermophile modéré

- + : croissance faible
- ++ : Croissance moyenne
- +++ : Bonne croissance
- : Pas de croissance

Tableau 15 : Optimum de salinité des souches isolées à 25 °C.

Souches	Concentration de NaCl en %					Optimum de salinité en %	Clas sification
	0	4	8	15	30		
IV N ₄ 248	+	++	+++	+++	+	15	halophile modéré
III N ₃ 238	-	+	++	+++	+++	entre 15 et 30	halophile extrême
IV N ₄ 240	+	++	+++	+++	+	entre 8 et 15	halophile modéré
III N ₃ 361	+++	+++	+++	+	-	entre 0 et 8	halotolérant
I N ₃ 256	+++	+++	+	+	-	entre 0 et 8	halotolérant
IV N ₄ 203	+++	+++	+	+	-	entre 0 et 4	halotolérant
IV N ₃ 333	+++	+++	+++	+	-	entre 0 et 8	halotolérant
IV N ₄ 149	++	+++	+++	++	+	entre 4 et 8	halotolérant
IV N ₄ 262	++	+++	+++	+	-	entre 4 et 8	halotolérant
I N ₄ 119	+	++	+++	+++	+	entre 8 et 15	halophile modéré
I N ₄ 118	+	+	+++	+++	+	entre 8 et 15	halophile modéré
II N ₄ 120	-	+	++	+++	+++	entre 15 et 30	halophile extrême
II N ₄ 220	+	+	+++	+++	-	entre 8 et 15	halophile modéré
III N ₃ 306	++	+++	+++	+++	+	entre 4 et 8	halotolérant
III N ₃ 309	+++	+++	++	++	-	entre 0 et 4	halotolérant
III N ₄ 308	+	+	+++	+++	+	entre 8 et 15	
III N ₃ 307	++	++	+++	++	-	8	halotolérant

- + : Croissance faible
- ++ : Croissance moyenne
- +++ : Bonne croissance
- : Pas de croissance

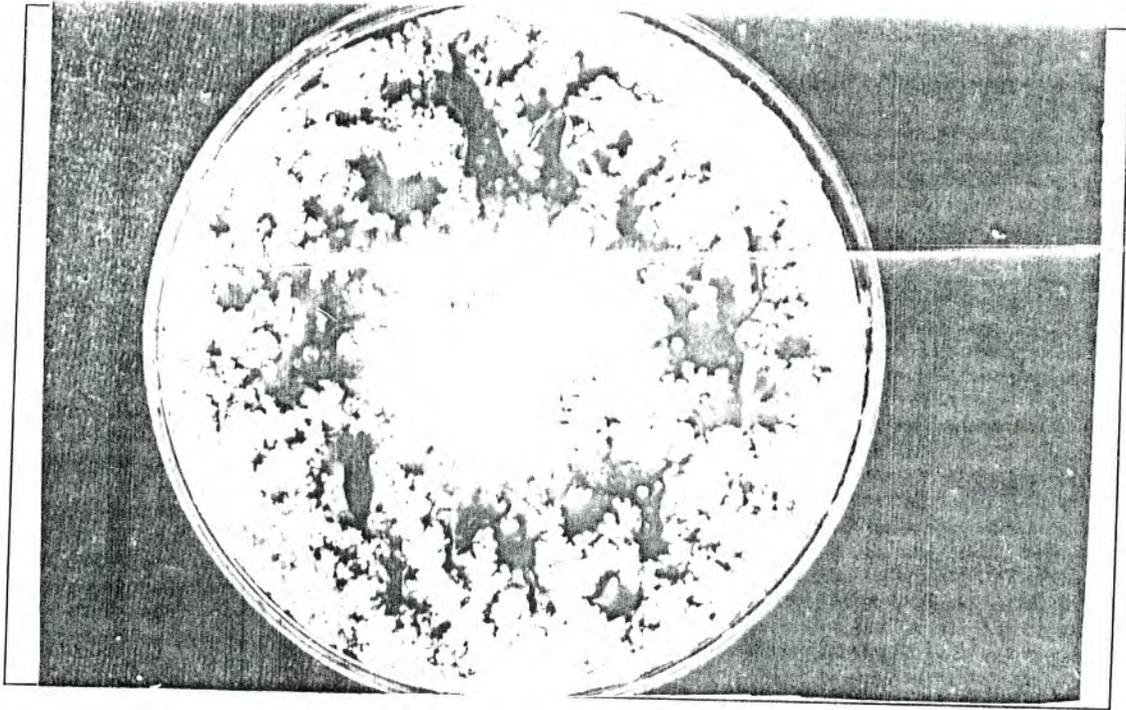


Figure 20 : La souche IV N₄ 118 poussant à 30 % de [NaCl] (Halophile modérée) apparentée à *Aspergillus Sydowi*

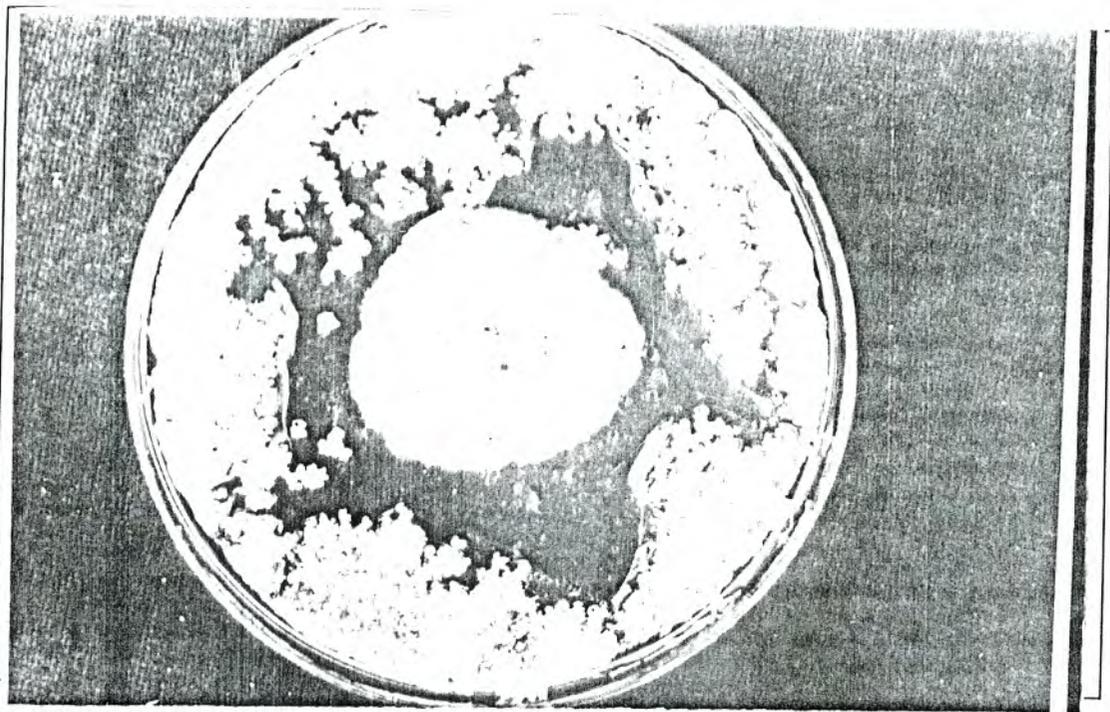


Figure 21 : La souche I N₄ 221 poussant à 30 % de [NaCl] (Halotolérante) apparentée au genre *Aspergillus*

2 . 2 . 5 - Distribution de la mycoflore du lac dans les quatre stations:

Selon l'halotolérance, la mycoflore du lac a été subdivisée en trois groupes: non halotolérants (121), halotolérants (136) et halophiles (91).

L'étude de la répartition des souches dans les 4 stations montre que les non halotolérants sont totalement absents dans la station IV a cause de sa forte salinité et se concentrent surtout dans les deux premières stations I et II.

Les souches halotolérantes sont présentes dans toutes les stations avec une prédominance dans les stations I II et III. Les halophiles sont rencontrés particulièrement dans la station IV (40 souches) puis en nombre moindre dans les autres stations(figure 22). Cette distribution particulière peut être attribuée à un phénomène d'adaptation.

En effet, malgré le fait que les 4 stations soient reliées entre elles notamment en Janvier (niveau d'eau plus important),on constate que les résultats sont similaires pour tous les prélèvements; ce qui explique que seules les souches adaptées survivent dans la station IV.

La distribution des genres selon les stations nous montre qu'il y a une grande diversité dans les stations I et II et qui sont les plus polluées soit 10 à 11 genres différents. Ce nombre diminue à 10 genres dans la station III et à 07 genres dans la station IV à cause de sa forte salinité. Nous remarquons aussi que les genres *Crysonilia*, *Cylindrocarpon*, *Crysosporium* et *Aureobasidium* sont totalement absents dans la station IV. Ces genres ont été classé parmi les non halotolérants ; ce qui explique leur absence dans la station IV .

A l'échelle de l'espèce , on constate que l'espèce *Aspergillus repens* est absente dans la station I et se concentre par contre dans la station IV(7 souches) et la station III(7 souches). Cette espèce a été classée halophile extrême ; ce qui explique cette distribution particulière de la souche .



CONCLUSION

L'analyse physico-chimique a montré que les eaux du lac sont caractérisées par une forte salinité et un pH légèrement alcalin. De ce fait c'est un milieu défavorable aux champignons qui sont connus comme étant acidophiles et non halotolérants. Cette étude physico-chimique a montrée également l'existence d'un gradient de pollution qui s'établit de la station I vers la station IV et d'un gradient de salinité dans le sens inverse de celui de la pollution . ces deux gradients exercent en plus du pH une forte pression de sélection sur la mycoflore du lac. Notons enfin que certaines espèces se sont adaptées à la forte salinité telle que *Aspergillus repens* . Cette espèce a été classée halophile extrême.

Le dénombrement de la mycoflore du lac dans les trois prélèvements a montré que les prélèvements effectués en Octobre sont plus riches que ceux de Janvier puis ceux de Juin ou l'élévation de la température limite le nombre de champignons surtout dans la station IV à cause de sa forte salinité due à l'évaporation . Cependant dans les autres stations le nombre est plus élevé et ce quelque soit la saison.

L'identification de 348 souches a révélé qu'elles appartiennent à différents groupes taxonomiques . En effet elles ont été rattachées à 12 genres différents et 23 espèces . Les genres les plus dominants sont : *Aspergillus* (145 souches rattachées à 11 espèces) , *Penicillium* (93 souches rattachées à 10 espèces) , *Rhizomucor* (35 souches) , *Fusarium*(19 souches rattachées à 2 espèces) , *Alternaria*(15 souches) , et *Trichoderma*(12 souches). Les genres les moins représentés sont: *Humicola*(9 souches), *Crysonilia*(7souches), *Cladosporium*(4 souches), *Cylindrocarpon*(4 souches) , *Crysosporium*(3souches) et *Aureobasidium*(2 souches).

Selon leur tolérance à la salinité, les souches ont été subdivisées en : halophiles (91 souches), halotolérants(136 souches) et non halotolérants (121 souches). L'étude de la thermotolérance a permis de les classer aux groupes des thermophiles (107 souches), thermotolérants (77 souches) et mésophiles (164 souches) .

La distribution de la mycoflore du lac dans les quatre stations a montré que les stations les plus polluées (station I et II)sont les plus riches en germes (11 genres différents) et ceci comparée à la station IV ou la salinité limite le nombre de germes surtout dans la période estivale ou l'évaporation d'eau est accrue permettant ainsi la concentration des sels dans la station IV.

Au terme de cette étude 23 souches ont été sélectionnées en raison de leur halotolérance et thermotolérance . Ces souches feront l'objet d'une évaluation de leur aptitude pour la production des antibiotiques et des enzymes dans la troisième partie.

Introduction

Les organismes extrêmophiles suscitent un intérêt particulier en raison de leur potentiel important dans la production de biomolécules hautement stables aux conditions physico-chimiques extrêmes.

L'intérêt des ces micro organismes dans l'industrie enzymatique ressort des travaux effectués par HORIKOSHI, (1996) ; VENTOSA et NIETO, (1996).

Cependant dans l'industrie pharmaceutique, les champignons suscite un intérêt particulier du fait qu'ils produisent 19,5% de l'ensemble des antibiotiques connus (LARPENT & SANGLIER, 1989).

L'utilisation des micro organismes extrêmophiles dans la dégradation des composés aromatiques a fait l'objet de nombreux travaux tels que ceux de SMITH et MORTENSEN, 1991 et HALOUI, 1989. Dans cette partie, nous allons évalué l'aptitude des souches extrêmophiles à produire des antibiotiques et des enzymes en vue de caractériser ces molécules.

I - Matériel et méthodes:

I - Aptitude des souches extrêmophiles à produire des antibiotiques ou des enzymes:

L'étude a porté sur 23 souches sélectionnées précédemment en raison de leur halotolérance et thermotolérance. Elle concerne l'aptitude de ces souches à produire des enzymes et des antibiotiques.

I . 1- Mise en évidence de l'Activité Antibiotique :

L'activité des 23 souches retenues est recherchée contre des germes - cibles suivants:

Bactéries Gram(-) : *Pseudomonas fluorescens* , *Salmonella enteridis* (*S*₁₅) et *Salmonella virchow* (*S*₅₉)

Bactéries Gram(+) : *Bacillus subtilis*

Levures : *Candida albicans*

L'origine des germes-cibles est indiqué dans le tableau 16

Les souches *Salmonella enteridis* (sensible aux Bêta-lactamines) et *Salmonella virchow*

(résistante aux Bêta-lactamines) ont été utilisées dans le but de sélectionner les souches non productrices des Bêta-lactamines .

I . 1 . 1 - Milieux de culture utilisés :

Le milieu CDA a été utilisé pour la croissance des souches productrices alors que les germes - cible sont cultivés sur le milieu Mueller Hinton (pour les bactéries) et la gélose Sabouraud semi - molle (pour la levure) .

I . 1 . 2 - Tests d'antibiose :

L'action antibiotique des souches sélectionnées est mise en évidence par la technique des cylindres d'Agar: Un inoculum prélevé à partir d'une culture bactérienne âgée de 18 heures ou levurienne âgée de 48 heures est mise en suspension dans 10 ml d'eau physiologique stérile, 0,2 ml de la suspension sont déposés au fond de la boîte de Pétri, puis on coule le milieu gélosé en surfusion à 45 °C. Après homogénéisation et refroidissement trois disques d'Agar de 5 mm de diamètre de chacune des souches sélectionnées (souches productrices) âgée de 5 à 7 jours sont déposés à la surface du milieu

préalablement ensemencé avec le germe-cible. La lecture s'effectue après 24 heures d'incubation pour les bactéries et 48 heures pour les levures par la mesure du diamètre d'inhibition du germe-cible

1. 2 - Mise en évidence de l'activité enzymatique:

1. 2 . 1 - Préparation du milieu de culture :

Le milieu de culture utilisé est le "Corn Steep Liquor" (C.S.L), sous produit de la maïserie de Maghnia dans le but de sa valorisation et limiter ainsi la pollution consécutive à son rejet. Il constitue la principale source d'azote. La source de carbone est apportée par le sirop de glucose. La composition du milieu de culture est choisie en se référant aux conditions optimales fixées par les travaux antérieurs effectués au laboratoire de Mycologie à l'université de Tlemcen. Pour cela le C.S.L est utilisé à 1/10 de matière sèche, additionné du sirop de glucose, sous chauffage à raison de 20 g/l.

Le milieu de culture ainsi préparé est réparti dans des flacons de 250 ml à raison de 50 ml par flacon. Les flacons sont ensuite stérilisés à 120 °C pendant 20 min.

1. 2 . 2 - Culture en milieu liquide :

Des flacons sont inoculés par des disques d'Agar prélevés à partir d'une culture des souches sélectionnées âgées de 05 à 07 jours. Après incubation à 30 °C pendant 9 jours, les milieux de culture sont filtrés en utilisant du papier filtre Selecta N° 589 et centrifugés à 5000 tours/mn pendant 10 mn. Les filtrats centrifugés sont répartis en aliquote et conservés à 4°C.

1. 2 . 3 - Mise en évidence de l'activité enzymatique :

Les activités α -amylasique et protéasique des filtrats centrifugés à 5000 tours/mn pendant 30 mn des souches fongiques testées ont été estimées selon la méthode décrite par **LEUCHTENBERGER et al**, (1989) Le milieu **SHLEGEL** modifié par **THANH**, a été utilisé comme milieu de base il constitue la fraction minérale.

La fraction organique sur laquelle on veut tester l'activité enzymatique est additionnée au milieu de base à raison de 1%.

Concernant l'activité protéasique, on utilise le lait écrémé stérilisé à 100° pendant 30 mn qu'on laisse refroidir à température ambiante pendant 24h et on le restérilise une deuxième fois de la même manière le jour qui suit.

L'activité-amylasique est recherchée en utilisant une solution d'amidon à 1% chauffée à 120° pendant 20 mn. Le mélange des deux fractions (minérale et organique) est répartie dans des boîtes de Petri de 13 cm de diamètre à raison de 40 ml par boîte. Après solidification du milieu et à l'aide d'un emporte - pièce on creuse dans la gélose des puits de 9 mm de diamètre qu'on remplit avec le filtrat à dosé à raison de 50 ml par puit.

L'incubation s'effectue à 40° pendant 6heures, puis à température ambiante pendant 2 heures.

L'activité proteasique est estimée par la mesure du diamètre de dégradation de la caséine contenu dans le milieu.

L'activité α amylasique est mise en évidence par l'ajout de 10 ml d'une solution iodée colorant le milieu en bleu violacé. Les zones de dégradation de l'amidon forment des anneaux claires autour des puits.

1.3 - Biodégradation :

1.3.1 - Biodégradation du 2.4 -D :

Les souches testées sont inoculées séparément dans deux flacons dont l'un contient 50 ml de CDB additionné du 2.4 -D à raison de 250 mg /l et l'autre contient seulement le CDB .Ce dernier est utilisé comme témoin .Les flacons sont incubés à 25 °C pendant 1: jours . les milieux sont ensuite filtrés et les mycéliums récupérés sont séchés à 65 °C pendant une nuit puis pesés . La dégradation du 2.4 - D par la souche fongique est estimée par le calcul de la différence du poids sec entre le flacon témoin et le flacon contenant le 2.4 - D.

1.3.2 - Dégradation du Benzène :

Afin d'étudier la capacité de ces champignons à dégrader le Benzène , on utilise le milieu CDB contenant le Benzène comme seule source de carbone à une concentration de 20ml/l. La croissance du champignon est signe de la biodégradation du Benzène.

Les souches productrices performantes seront sélectionnées pour une étude préliminaire des molécules qu'elles produisent (antibiotiques et enzymes).

2 - Etude préliminaire des activités antibiotiques, enzymatiques et de la biodégradation des souches extrêmophiles :

2.1 - Production d'antibiotique par la souche SM2 :

2.1.1 - Souche productrice :

La souche utilisée pour cette étude est la IIN₀ 290 que nous appellerons dans la suite du travail SM₂ , identifiée à l'espèce *Aspergillus wentii* . elle a été isolée à partir de la station II . Elle a été sélectionnée en raison de sa grande thermotolérance (optimum de croissance à 40°C) d'une part et de son action antimicrobienne intéressante d'autre part.

2.1.2 - Micro-organismes - cible :

L'activité antimicrobienne de la souche SM2 est recherchée vis à vis de différents germes-cibles reconnus comme étant plus résistants que les germes utilisés précédemment:

- Bactéries Gram + : *Bacillus cereus* et *Staphylococcus aureus* .
- Bactéries Gram - : *Escherichia coli* et *Salmonella typhi* .
- Levures (champignons levuriforme) : *Rhodotorula mucilaginosa*
- Champignons filamenteux : *Alternaria* sp₂ (BL4) *Botrytis cinerea* (BK1) et *Fusarium oxysporum albedinis* (FOA)

Le nom et l'origine de ces germes sont donnés dans le tableau 16.

2.1.3 - Production d'antibiotique en milieu liquide:

Des Erlenmeyers de 250 ml contenant 50 ml du milieu Czapek's liquide (CDB) sont inoculées par des disques prélevés à partir de la préculture. L'incubation se fait avec agitation rotative (120 tours/mn) à une température de 40 °C pendant 15 jours.

Des prélèvements sont effectués chaque jour pour mesurer :

- La croissance
- La production d'antibiotique
- Le pH.

1) - Mesure de la croissance :

Après incubation les milieux de fermentation sont filtrés sur du papier filtre Selecta N° 5893. Les myceliums récupérés sont séchés à 105 °C pendant 2 heures puis pesés tandis que les filtrats sont centrifugés à 5000 tours/mn pendant 10 mn afin d'éliminer les particules en suspension, ils sont ensuite répartis en aliquote et conservés à 4 °C. La mesure du pH se fait après chaque prélèvement en utilisant un pH mètre du type UNICAM.

2) - Mesure de la production d'antibiotique :

La production d'antibiotique est suivie par la technique de diffusion sur disque de papier (antibiographie).

Des disques de papier stérile de 6 mm de diamètre préalablement imprégnés de 40 µl de milieu de fermentation sont déposés dans des boites de Pétri contenant un milieu gélosé ensemencé par le germe cible choisi. Les boites sont mises à 4 °C pendant 4 Heures pour permettre la diffusion de l'antibiotique. Elles sont ensuite incubées dans l'étuve à 30 °C pendant 48 Heures.

L'activité antibiotique est estimée par la mesure de la zone d'inhibition du germe cible.

2 . 1 . 4 - Extraction de l'antibiotique :

Pour isoler et purifier l'antibiotique élaboré par la souche SM2 nous avons utilisé le protocole figurant dans la figure 25.

Dans une ampoule à décanter, on mélange 100 ml du filtrat centrifugé avec 25 ml de différents solvants organiques; Acétate d'Ethyle, chloroforme, benzène et l'hexane.

Le mélange est agité pendant 02 à 04 Heures, puis on laisse reposer. Celui-ci se répartit en deux phases; une phase aqueuse et une phase organique.

L'activité est recherchée dans l'extrait. Le coefficient de partage K est calculée de la façon suivante :

$$K = \frac{\text{Activité antibiotique de la phase organique}}{\text{Activité antibiotique de la phase aqueuse}}$$

Si $K < 1$: donc l'antibiotique persiste dans le surnagent.

Dans ce cas on effectue une 2ème extraction.

Si $K > 1$: Donc l'antibiotique a été presque totalement extrait du surnagent.

Le meilleur solvant d'extraction correspond au coefficient de partage K le plus élevé.

Tableau 16: Noms et origines des germes - cible :

Germes-cible		Origine	
Bactéries	Gram(+)	<i>Staphylococcus aureus</i>	collection USTHB
		<i>Bacillus cereus</i>	ATTC 9634
	Gram (-)	<i>Escherichia coli</i>	ATTC 25822
		<i>Pseudomonas fluorescens</i>	IPA
		<i>Salmonella enteridis</i>	Collection de laboratoire de génétique USTHB
		<i>Salmonella virschows</i>	Collection de laboratoire de génétique USTHB
Levures	<i>Candida albicans</i>	Collection URZA	
	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	Collection URZA	
Champignons filamenteux	<i>Alternaria sp₂</i> (BL4)	Palmerai de la région de Ouargla	
	<i>Botrytis cinerea</i> (BKH)	INPL (France)	
	<i>Fusarium oxysporum albedinis</i> (FOA)	Collection URZA	

Tableau 16: Noms et origines des germes - cible :

Germes-cible		Origine	
Bactéries	Gram(+)	<i>Staphylococcus aureus</i>	collection USTHB
		<i>Bacillus cereus</i>	ATTC 9634
	Gram (-)	<i>Escherichia coli</i>	ATTC 25822
		<i>Pseudomonas fluorescens</i>	IPA
		<i>Salmonella enteridis</i>	Collection de laboratoire de génétique USTHB
		<i>Salmonella virschows</i>	Collection de laboratoire de génétique USTHB
Levures	<i>Candida albicans</i>	Collection URZA	
	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	Collection URZA	
Champignons filamenteux	<i>Alternaria sp₂</i> (BLA)	Palmerai de la région de Ouargla	
	<i>Botrytis cinerea</i> (BKII)	INPL (France)	
	<i>Fusarium oxysporum albedinis</i> (FOA)	Collection URZA	

2.1.5 - Purification de l'antibiotique :

Des techniques chromatographiques sont utilisées pour purifier l'antibiotique produit par la souche SM₂

2.1.5.1 - Chromatographie sur couche mince :

a) - Chromatographie analytique :

Des plaques de gel de silice Kiesel gel 60 F 254 (20x 20) sont utilisées. L'extrait actif de la souche SM₂ est chromatographié à 03 cm du bord inférieur de la plaque en petits volumes de 100 µl, puis séchées sous courant d'air froid. Les plaques sont déposées dans des cuves saturées avec 100 ml de différents systèmes de solvants :

Système I : n - Butanol - Acide acétique - Eau (3/1/1)

Système II : Chloroforme - Méthanol - Ammoniac 14% (2/1/1)

Système III : n - Butanol - Acétone (2/1)

Système IV : n - Butanol - Méthanol - Eau (6/1/3)

Système V : Acétate d'éthyle - Méthanol - Eau (2/1/2)

système VI : Eau 100%

La migration est arrêtée lorsque le front du solvant aura parcouru 15 cm du point de départ. Après séchage pendant une nuit à température ambiante. Les chromatogrammes sont observées à l'oeil nu et sous U.V à 365 nm et 254 nm.

La couleur et le rf des tâches observées sont notés.

b) - Révélation microbiologique des chromatogrammes

(Bioautographie, BETINA, 1983) :

Toutes les tâches qui apparaissent sur les chromatogrammes ne sont pas des antibiotiques.

Pour détecter ces derniers, nous avons fait appel à la bioautographie dont la technique est la suivante :

Les chromatogrammes sont déposés dans une boîte en plastique (22 x 24 cm²) stérile.

Du papier Watman imbibé d'eau distillée; stérile est déposé sur le fond de la boîte pour humidifier l'atmosphère et empêcher ainsi la dessiccation rapide de la gélose.

Du milieu gélosé semi-solide (10g/l) en surfusion contenant un germe-cible est répartie sur les chromatogrammes à l'aide d'une pipette stérile.

Les boîtes sont incubées à 4 °C, puis mises dans l'étuve à 30 °C pendant 24 heures à 48 heures. Les rf des zones d'inhibition sont notées.

c) - chromatographie préparative sur couche mince :

60 g de gel de silice 60 G en poudre sont mélangés à 120 ml d'eau distillée stérile. Le mélange obtenu est étalé sur des plaques en verre (20 x 20 cm²) à l'aide d'un étaleur.

Après 30 mn de séchage à température ambiante les plaques sont introduites dans un four Pasteur à 105 °C pendant 1 heure pour activer le gel (RONDERAT, 1971).

L'extrait actif est chromatographié à 30 cm du bord inférieur des plaques. Ces dernières sont ensuite mises dans des cuves saturées par le système de solvant choisi.

Les zones actives sont récupérées dans du méthanol

L'extrait est concentré, puis conservé à 4 °C pour servir par la suite à la réalisation des tests d'activité.

2 . 1 . 6 - Essai de caractérisation de l'activité antibiotique élaborée par la souche SM2 :

2 . 1 . 6 . 1 - Solubilité :

Des tests de solubilité de l'antibiotique sont réalisés.

Les solvants utilisés de polarité décroissantes : N-Hexane, Benzène, Chloroforme, Acétate d'Ethyle et l'eau.

L'extrait actif est séché, puis repris avec l'un des solvants.

L'activité dans les solutions obtenues est recherchée par la technique d'antibiographie.

2 . 1 . 6 . 2 - Révélation chimique (réaction chromogénique) :

Parallèlement à la bioautographie, nous avons effectué des révélations chimiques sur des plaques ayant migrées dans les mêmes conditions que précédemment afin de pouvoir effectuer les corrélations aux mêmes r_f entre l'activité biologique et les révélations spécifiques. Les principaux révélateurs utilisés sont (réactifs MEREK, 1980):

1) - Révélation des acides aminés :

Une solution de ninhydrine (0,3 g de ninhydrine dans 100 ml de n-butanol additionné de 3 ml d'acide acétique) est pulvérisée sur les chromatogrammes.

Les plaques sont séchées à 105 °C pendant 2 minutes.

Une réaction positive s'exprime par l'apparition d'une tache violette au r_f déterminé.

2) - Révélation des sucres :

Solution A: dissoudre 0.2g de naphtolrésorcinol dans 100ml d'éthanol

Solution B: acide sulfurique 20%

Solution de vaporisation: mélanger des volumes égaux des solutions A et B.

Les chromatogrammes sont ensuite séchés à 105°C pendant 10 mn . une réaction positive se traduit par une coloration marron au r_f déterminé.

3) - Révélation des lipides :

Une solution de bleu de bromothymol (0,4 g de bleu bromothymol dissout dans 100 ml de souche en solution 0,01 mole/l) est supervisée sur le chromatogramme.

L'examen se fait à l'œil nu. Une réaction positive se traduit par une coloration au r_f déterminé.

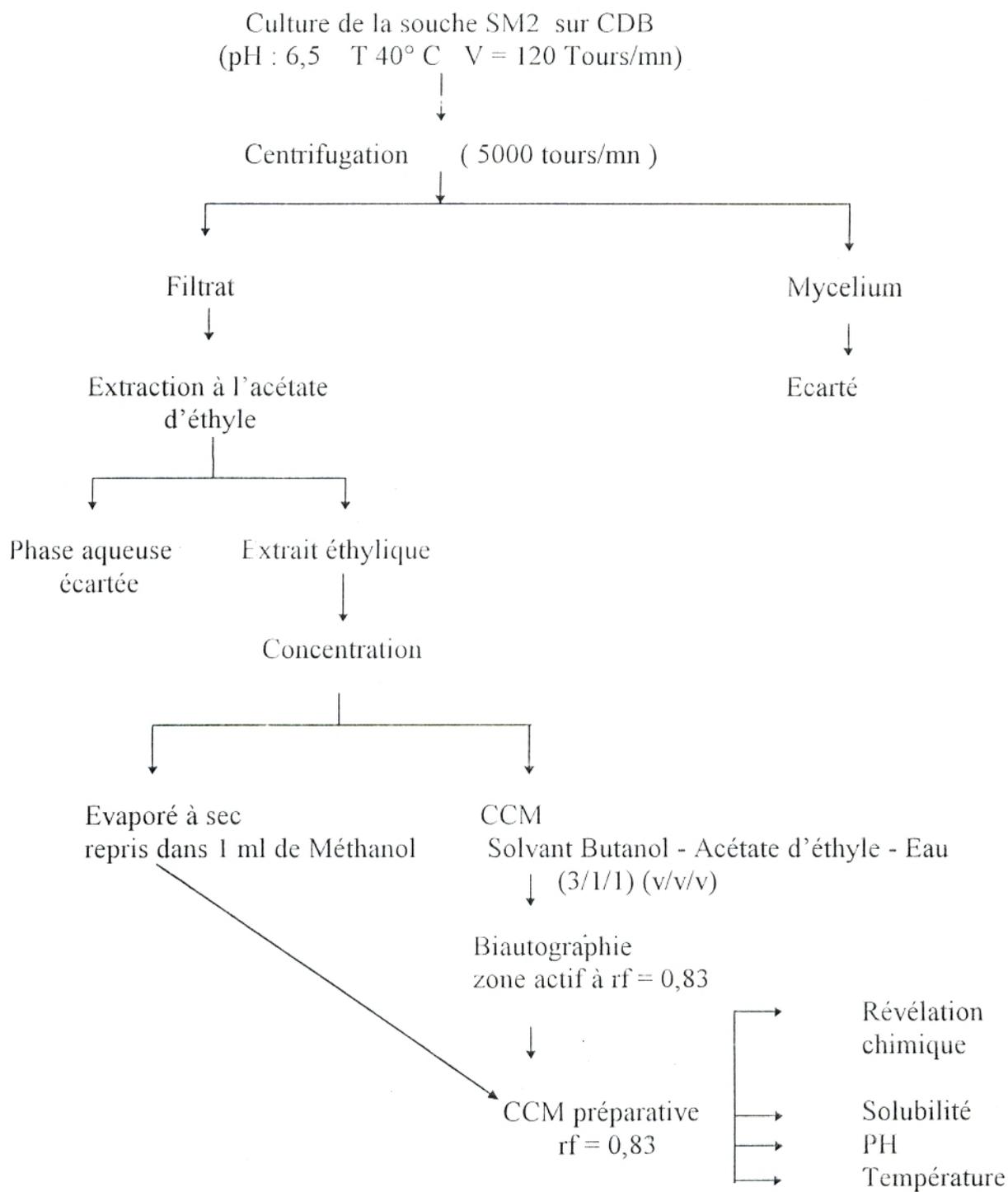


Figure 25 / Schéma d'extraction et de purification du composé ASM2

2 . 1 . 6 . 3 - Etude de la stabilité du produit actif :

1) - Stabilité selon la température :

L'extrait actif est mis dans un bain-marie réglé à différentes températures 45 °C, 55 °C , 75 °C, 85 °C et 95 °C. En plus un autoclavage du produit a été effectué à 120 °C pendant 20 min.

Après incubation de 30 mn à la température choisie, l'activité est recherchée dans l'extrait par la méthode d'antibiographie.

2) - Stabilité en fonction du pH:

Des fractions de 20 ml du surnageant de culture sont ajustées aux différents valeurs de pH (2,3 , 5 , 7 , 9 et 10) avec des solutions de NaOH 1N et de HCL 1N. L'activité est testée par la technique d'antibiographie.

3 - Stabilité au cours de la conservation :

la stabilité du composé ASM₂ a été étudiée durant deux semaines de conservation à 0°C et à 4°C . L'activité est estimée par la technique d'antibiographie.

2 . 2 - Production de l' α -amylase en milieu liquide :

Les flacons sont inoculés par des disque d'Agar prélevés à partir d'une préculture âgée de 05 à 07 jours. L'incubation s'effectue à 40 °C pendant 15 jours. Des prélèvements sont effectués chaque jour, pour mesurer :

- La croissance.
- L'activité enzymatique.

2 . 2 . 1 - Effet du NaCl sur la production de l' α -amylase :

Afin d'étudier l'effet du NaCl sur la production de l' α -amylase différentes concentrations de NaCl ont été additionnées au milieu de culture : 3 %, 5 %, 7 %, 10 %, 20 % et 25 % de NaCl.

Après incubation l'activité est recherchée par la méthode Plate Test Agar (PTA).

2 . 2 . 2 - Méthodes d'analyse :

Après fermentation, les milieux de culture sont filtrés sur du papier filtre Selecta N° 5893 et centrifugés à 5000 tours/mn pendant 10 mn. Les filtrats centrifugés sont répartis en aliquotes et conservés à 4 °C.

2 . 2 . 2 . 1 - Dosage des protéines totales par la méthode de LOWRY :

Les acides aminés aromatiques tyrosine et tryptophane des protéines réagissent avec le cuivre alcalin et le phosphomolibdate du réactif folin-ciocalteau pour donner des complexes colorés. L'intensité de la coloration dépend de la quantité d'acides aminés aromatiques présents et varie selon les protéines.

◇ **Réactifs**

- **Solution A:** Solution de carbonate de sodium alcalin (20g / l Na₂CO₃ dans 0,1 Môle / l de soude).
 - **Solution B:** Solution de sulfate de cuivre et de tartarate double de sodium et de potassium (5 g/l CuSO₄ - 5 H₂O) dans une solution de tartarate de Na et K à 10 g/l.
 - **Solution alcaline:** C'est un mélange de 50 ml de la solution A et 1 ml de la solution B.
 - **Solution de protéine témoin :** Solution mère d'Albumine bovine 500 µg/ml à partir de laquelle une gramme étalon est préparée allant de 10 µg/ml à 500 µg/ml.
- **Réactif de folin ciocalteau :** C'est un mélange de tungstate de sodium et de molybdate de sodium dans l'acide phosphorique et l'acide chlorhydrique.
Le réactif est dilué avec égal volume d'eau distillée le jour de l'épreuve.

◇ **Technique :**

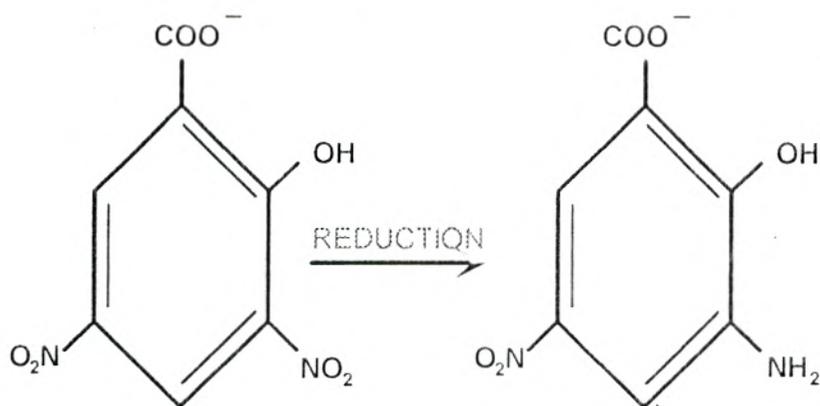
Le taux de protéines a été dosé dans le milieu de culture non inoculé et dans les filtrats. Les échantillons dosés ont été dilués au 1/100.

500 µl de l'échantillon ou de la solution étalon sont additionnés à 2,5 ml de solution alcaline. Le mélange est incubé à température ambiante pendant 10 min. 0,25 ml de réactif de folin ciocalteau, sont ajoutés dans chaque tube.

Les solutions sont incubées à l'abri de la lumière pendant 30 min. Enfin la D.O de chaque solution est lue au spectrophotomètre à 750 nm. La concentration en protéine (mg/ml) est déterminée à l'aide de la courbe d'étalonnage D.O = f([Albumine bovine]).

2 . 2 . 2 . 2 - Mesure de l'activité α-amylasique :

- **Principe :** L'α-amylase catalyse l'hydrolyse des liaisons α (1-4) de l'amidon avec production des sucres réducteurs . La réaction est suivie par dosage de l'augmentation de la concentration de ces derniers en utilisant le réactif à l'acide 3,5-Dinitrosalicylique (DNSA). Une solution alcaline de l'acide 3,5-Dinitrosalicylique est réduite en acide 3-amino-5-nitrosalicylique .



ORANGE ROUGE

La réduction est suivie en mesurant l'absorbance à 750 nm .

◇ **Réactifs :**

- Substrats : Amidon soluble 1% préparé par dissolution dans 100 ml de tampon phosphate, 0,2 M , pH 6 .
- Réactif DNSA : 1 g d'acide 3-5 dinitrosalicylique dissout dans 20ml de NaOH 2N et 50 ml d'eau distillée ; on ajoute 30 g de tartate double de sodium potassium et on complète à 100 ml avec de l'eau distillée .

◇ **Technique:**

- 0,5 ml du substrat sont prélevés dans des tubes :
 - 0,5 ml d'une dilution de l'extrait enzymatique de 1/5 sont ajoutés .
- La réaction s'effectue à 25°C pendant 30 mn, elle est arrêtée par addition de 1 ml d'acide dinitrosalicylique dans chaque tubes .
- Le mélange est ensuite incubée pendant 10 mn dans un bain - marie à 100°C ; le volume finale est ajusté à 22 ml avec de l'eau distillée .
- La lecture de la D.O est effectuée à 540 nm contre le blanc . la concentration des sucres réducteurs correspondant est déterminé à partir d'une courbe étalon avec le maltose .La quantité d'amidon hydrolysée est donnée par :

$$\frac{[F]-[T]}{0,5 \times 30} \times 5 \quad \mu \text{ mole / min . ml}$$

T : Temoin F : FILTRAT

2 . 2 . 2 . 3 - Purification de l' α -amylase :

La technique utilisée pour purifier l' α -amylase est la précipitation par les solvants organiques décrite par **RUSTOM, 1986**. Les protéines en présence du solvant organique tendent à réagir entre elles plutôt qu'avec les molécules d'eau; ce qui entraîne leur précipitation (**GILBERT et PIERRE, 1982**).

20 ml de l'échantillon sont mélangés avec 80 ml d'éthanol à 95 % et ceci à 4 °C. Le mélange est agité puis on laisse reposer pendant 15 min. La solution est filtrée à l'aide du Buchner sous vide puis lavée une deuxième fois avec 80 ml d'éthanol à 95 %. Le précipité ainsi formé est repris dans 20 ml d'eau distillée.

L'extrait enzymatique obtenu est conservé à 4 °C. L'activité α -amylasique est recherchée dans l'extrait par la méthode au **DNSA**. La teneur en protéines de l'extrait est estimée par la méthode de **LOWRY**.

2 . 3 - Biodégradation de 2,4 - D :

On prépare le milieu C.D.B à différents concentration de 2,4 - D (240 ; 480 ; 720 ; 960 ; 1200 ; 1800 ; 2400 ; 3000 ; 3600 ; 4200 ; 4800 ; 5400 ; 6000 mg/l), afin d'étudier leur influence sur le développement des deux champignons sélectionnés (*Aspergillus terreus* ; *Penicillium chrysogenum*).

2 . 4 - Biodégradation de benzène :

On prépare le milieu C.D.B sans saccharose . Ce dernier est remplacé par le « Benzène » à différentes concentrations (20 ; 25 ; 30 ; 35 ; 40 ml/l) à fin d'étudier leur influence sur le développement des deux champignons sélectionnée (*Penicillium expansum* , *Aspergillus flavus*) .

II - Résultats et discussion:

1 - Evaluation de l'aptitude des souches pour la production d'antibiotiques et d'enzymes :

L'ensemble des résultats obtenus avec les 23 souches sont donnés dans les tableaux 17 et 18.

Parmi les 23 souches étudiées 13 ne présentent aucune activité . les 10 autres ont une action contre au moins un des germes - cible.

- 2 souches ont une action antifongique sur *Candida albicans* (IIN₃ 307 et IIN₄ 308).

- 5 souches ont une action sur les bactéries (IVN₄ 119 , IVN₄ 248 , IIN₃ 238 , IN₃256 et la IVN₄ 333).

- 3 souches sont actives sur les bactéries et sur *Candida albicans*(VI N₄ 223 , III N₄ 213 et la SM₂).

Concernant la nature de l'antibiotique élaboré par les souches on peut dire que 5 élaborent des antibiotiques de nature bêta - lactamine , 2 produisent des antifongiques et les 3 autres souches sécrètent des molécules autre que les Bêta -lactamines.(tableau 18)

Concernant la production des enzymes , 14 souches produisent des enzymes protéolytiques et/ou amylasiques Parmi celles - ci la souche (III N3 306 identifiée à *Aspergillus niger* . Cette espèce est largement utilisée en industrie ammidonière .

L'étude de la dégradation du 2,4-D et du Benzène a permis de mettre en évidence 2 souches particulièrement intéressantes pour la dégradation du 2,4-D (*Aspergillus candidus* et *Penicillium chrysogenum*) et 2 autres qui dégradent le Benzène (*Aspergillus flavus* et *Penicillium expansum*

1 . 2 - Détermination de l'activité antibiotique de la souche SM₂ :

Parmi les trois milieu utilisés la gélose CDA a permis une meilleure production d'antibiotique par la souche SM₂.

On note une très forte activité sur les levures *Candida albicans* et *Rhodotorula mucilagenosa*, une forte activité sur les bactéries Gram(+) *staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* et les bactéries Gram(-) *Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens* et *Salmonela typhy*.

Sur les champignons filamenteux, l'activité varie selon l'espèce, le champignon le plus fortement inhibé est *Botrylis cinerea*. La sensibilité des deux autres souches est moyenne.

On constate donc que l'intensité du spectre d'action de la souche SM₂ ce sont révélé très intéressantes ceci nous a poussé à identifier la souche puis à étudier son activité de façon plus détaillée.

1 . 3 - Cinétique de croissance et de production de l'antibiotique : (Figure 26)

Après une courte phase de latence, la croissance augmente jusqu'au 7^{ème} jour puis elle se stabilise jusqu'au 9^{ème} jour, puis la biomasse chute au 10^{ème} jour et au 11^{ème} jour.

La production de l'antibiotique s'amorce en phase stationnaire se traduisant par l'augmentation de l'activité.

Les valeurs du pH fluctuent entre 6 et 6,5 puis augmentent au 7^{ème} jour pour se stabiliser par la suite à la valeur pH 7.

Tableau 17: Aptitude des souches sélectionnées :

Souches	Tests d'antibièse			Tests enzymatiques		Tests de biodégradation	
	<i>Bacillus cirreus</i>	<i>Pseudomonas aerogenosa</i>	<i>Candida albicans</i>	Protéase	Amylase	2,4 D	benzène
IVN ₄ 248	-	-	-	+	-	-	-
IIIN ₃ 238	+	+	-	-	-	-	+
IVN ₄ 240	-	-	-	+	+	-	-
IIIN ₃ 361	-	-	-	-	-	-	-
IN ₃ 256	+	-	-	-	-	+	+
IVN ₄ 203	-	-	-	+	+	-	+
IVN ₃ 333	+	+	-	-	+	-	-
IVN ₄ 149	-	-	-	+	+	-	-
IVN ₄ 262	+	-	-	-	+	+	+
IN ₄ 119	+	+	-	+	!	;	-
IN ₄ 118	-	-	-	+	+	-	-
IIIN ₄ 120	-	-	-	-	-	+	-
IIIN ₄ 220	-	-	-	+	+	+	+
IIIN ₄ 221	-	-	-	+	+	-	-
IIIN ₃ 306	-	-	-	+	+	-	-
IIIN ₃ 309	-	-	-	-	-	-	-
IIIN ₃ 307	-	-	+	-	-	+	+
IIIN ₄ 308	-	-	+	-	-	-	-
IVN ₂ 204	-	-	-	+	-	+	-
IIIN ₄ 213	+	+	-	+	+	+	-
IVN ₄ 223	+	+	+	-	-	+	+
IN ₃ 101	-	-	-	+	+	-	-
IIIN ₃ 301	-	-	+	+	+	-	+
SM ₂	+	+	+	-	-	-	-

Tableau 18 : Mise en évidence de la production de Bêta - lactamines:

Souches	<i>Salmonella enteridis</i> S15	<i>Salmonella virchows</i> S59	Bêta -lactamine
- IVN ₄ 119	+	-	+
- IIIN ₃ 307	-	-	-
- IVN ₄ 248	+	-	+
- IIIN ₃ 238	+	-	+
- IN ₃ 256	+	-	+
- IVN ₃ 333	+	-	+
- IIIN ₄ 308	-	-	-
- IIIN ₄ 213	+	+	-
- IVN ₄ 223	-	+	-
- SM ₂	+	+	-

Tableau 19: Spectre d'activité de la souche SM₂:

Germes-cible			Action antagoniste (mm)
Bactéries	Gram(+)	<i>Staphylococcus aureus</i>	17
		<i>Bacillus cereus</i>	14
	Gram (-)	<i>Escherichia coli</i>	18
		<i>Pseudomonas fluorescens</i>	13
		<i>Salmonella typhi</i>	15
Levures		<i>Candida albicans</i>	16
		<i>Rhodotorula mucilagenosa</i>	28
Champignons filamenteux		<i>Alternaria sp2 (BL4)</i>	11
		<i>Botrytis cinerea (BKH)</i>	13
		<i>Fusarium oxysporum albedinis (FOA)</i>	9

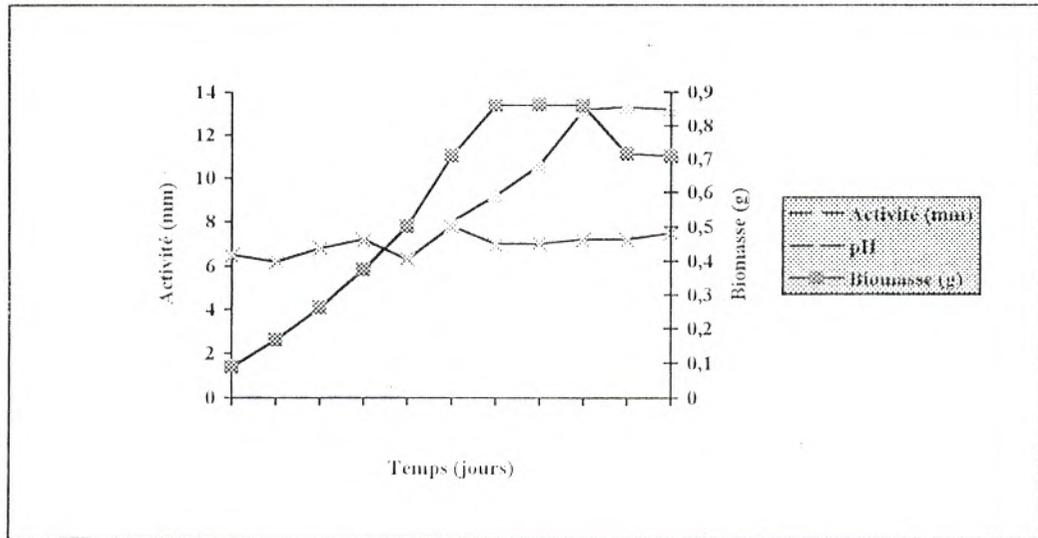


Figure 26 : cinétique de croissance et de production de l'antibiotique par la souche SM₂.

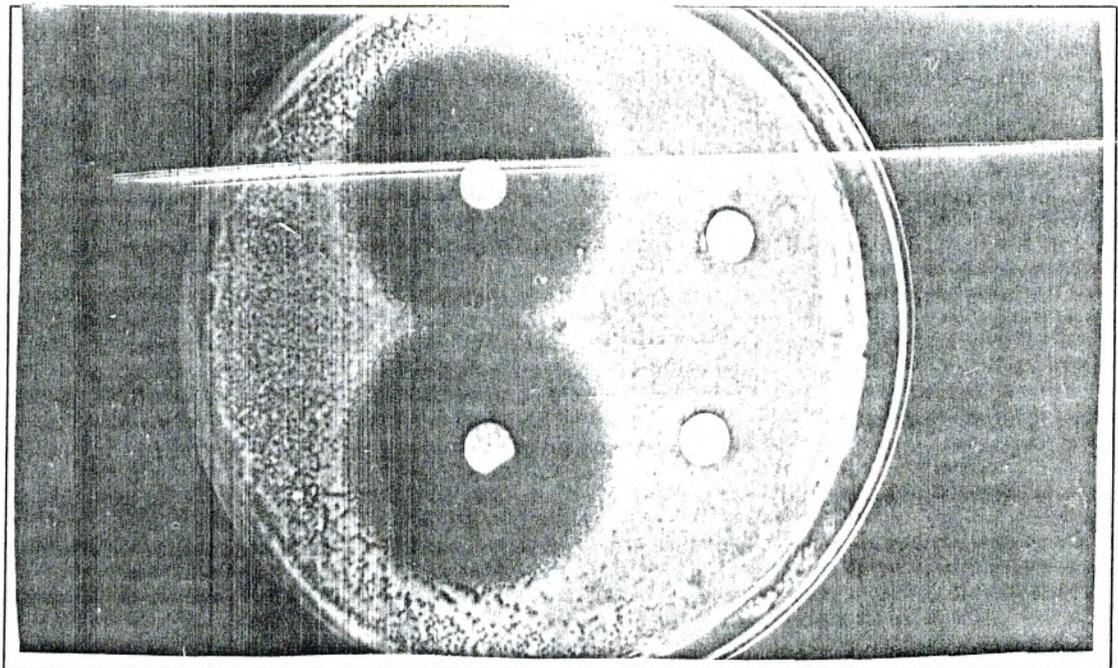


Figure 27 : Activité antibiotique de l'extrait actif de la souche SM₂ sur *Rhodotorula mucilagenosa* par la méthode d'antibiographie.

1.4 - Extraction des substances actives :

L'activité antibiotique est retrouvée uniquement dans les extraits butyliques et éthyliques. Dans ce dernier, l'activité antibactérienne et antifongique est similaire à celle retrouvée dans le milieu liquide avant extraction.

1.5 - Purification de l'antibiotique :

1.5.1 - Choix du système de solvant :

La système n - butanol, acide acétique, eau (3,1,1) a donné une bonne séparation du mélange et ceci par le nombre de tache visible à l'oeil nu et sous U.V. Cependant on observe des traînées avec les cinq autres systèmes

1.5.2 - Analyse des chromatogrammes :

1) - Chromatographie en couche mince:

Nous avons retrouvé une zone d'inhibition au $rf = 0,83$ dans le système n - butanol, acide acétique, eau (3,1,1). L'observation à l'oeil nu est sous U.V à 365 nm et 254 nm met en évidence plusieurs taches colorées. La tache correspondante au $rf = 0,83$ est incolore à 365 nm.

2) - Chromatographie en couche mince préparative :

On récolte la fraction active de $rf = 0,83$ dans un méthanol, les tests d'activité ont montré qu'elle est active sur les bactéries et les champignons tests .

1.6 - Essai de caractérisation de l'antibiotique ASM₂:

1.6.1 - Solubilité :

Les résultats obtenus montrent qu'en utilisant les solvants organiques suivant le benzène, l'hexane, l'eau, aucune activité n'est observée. Par contre dans l'acétate d'éthyle et le butanol, l'activité du composé ASM₂ est retrouvée.

1.6.2 - Révélation chimique :

Les chromatogrammes obtenus après pulvérisation des réactifs spécifiques sont illustrés dans la planche I figurant en annexe .

1) - Recherche des sucres :

Des taches de couleur marron sont observés, ces dernières ne correspondent pas au rf des taches actives révélées auparavant par la technique bioautographique. Ces sucres proviennent du milieu .

2) - Recherche des acides aminés :

Le chromatogramme pulvérisé avec la ninhydrine ont donnés des résultats négatifs. La pulvérisation Ce résultat indique que le composé ASM₂ ne renferme pas des groupements aminés NH₂. Donc la molécule n'est pas de nature peptidique.

3) - Recherche des lipides :

Aucune coloration spécifique n'a été détectée au niveau de la tache active .

1.7 - Thermostabilité :

Les résultats de l'influence de la température sur l'activité de l'antibiotique du composé ASM₂ ont montrés que ce dernier est thermostable et il est actif à des températures dépassant 85 °C. Cette activité persiste après autoclavage à 120 °C pendant 20 minutes, cependant elle disparaît à des températures supérieures.

Tableau 20 : Analyse chromatographique des extraits actifs et révélation microbiologique :

Souche	Couche active	rf	Couleur		Activité	
			Œil nu	U.V (360nm)	antibactérienne	Antifongique
SM ₂	C1	0,83	Marron	Rose	11	25

Tableau 21 : influence de la température sur l'activité antimicrobienne de la souche SM2

Souche	Températures Germes-cible	Températures non traité par la chaleur	Chauffage					
			30 mn à 50 °C	30 mn à 70 °C	15 mn à 90° C	15 mn à 100 °C	15 mn à 130 °C	10 mn à 130 °C
SM ₂	<i>Bacillus cereus</i>	14	14	14	14	14	10	-
	<i>Rhodotorula mucillagenousa</i>	28	28	28	28	28	21	-

- Activité nulle

Tableau 22 : Stabilité de l'activité antimicrobienne selon le pH:

Souche	Germe cible	pH					
		2	3	5	7	9	10
	<i>Bacillus cereus</i>	-	11	14	14	10	-
SM ₂	<i>Rhodotorula mucillagenousa</i>	-	23	28	28	21	-

TABLEAU n° 23 :Evaluation de l'activité α-amylasique dans l'extrait enzymatique du milieu de fermentation de *A.niger* I après précipitation à l'éthanol .

ECHANTILLON	activité α-amylasique (U I)	Taux de protéine	activité spécifique (UI/ mg)
Milieu de fermentation	2.81	1.24	2.26
Extrait enzymatique	1.92	0.17	11.29

1 . 8 - RECHERCHE DE L'ACTIVITE AMYLOLYTIQUE :

1 . 8 . 1 - Effet du Nacl sur la production de l' α -amylase :

L'activité α -amylasique à 3% et 5% de NaCl est aussi importante que celle enregistrée à 0% de NaCl. Cependant cette activité chute aux valeurs supérieures et s'annule à 25% de NaCl (Figure 28)

1 . 8 . 2 - Evaluation de l'activité α -amylasique :

L'activité α -amylasique augmente progressivement au cours de l'incubation pour se stabiliser vers le 11^{ème} jour où l'activité α -amylasique maximale se situe vers 2,26 U/mg qui coïncide avec la phase stationnaire du développement de *A.niger* I.

1 . 9 - Purification de l' α amylase par précipitation a l'éthanol :

A une température ambiante le milieu de fermentation traité par l'éthanol présente une activité α -amylasique nulle (pas de précipitation de l'enzyme).

A 4°C, une partie de l'enzyme est précipitée par le solvant, ainsi l'activité spécifique de l' α amylase dans le précipité (dissout dans l'eau distillée) est de 11,29 U/mg, soit 5 fois plus élevée que celle du milieu de fermentation (Tableau 23).

Le milieu de fermentation contenait, initialement 1,240 mg /ml de protéine, l'éthanol a permis de précipiter 12,60% de ces protéines qui présentent une activité α - amylasique très élevée (11,29U/mg), l'amylase constituerait la majeure partie de ces protéines.

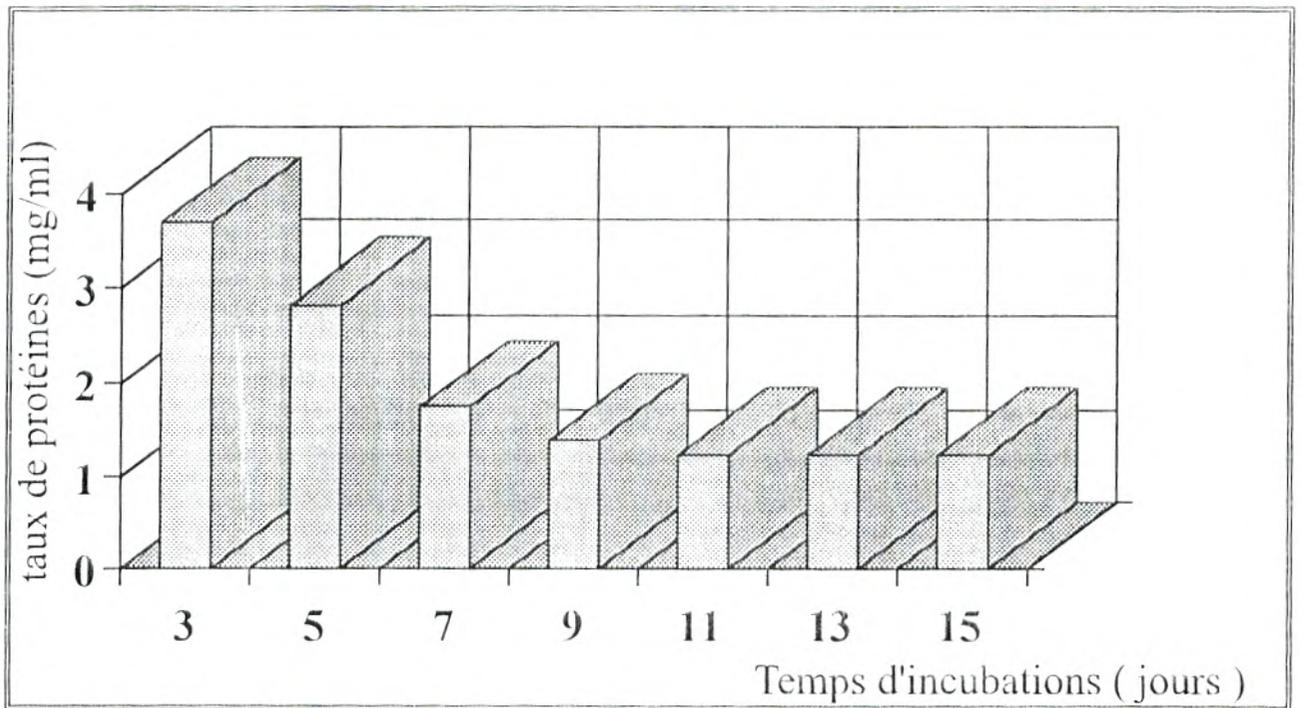


Figure 29 :Evaluation du taux de protéines dans le milieu de fermentation de *Aspergillus.niger* au cours de l'incubation (CSL 12,33 % MS , pH 5 , T 25 ± 1°C)

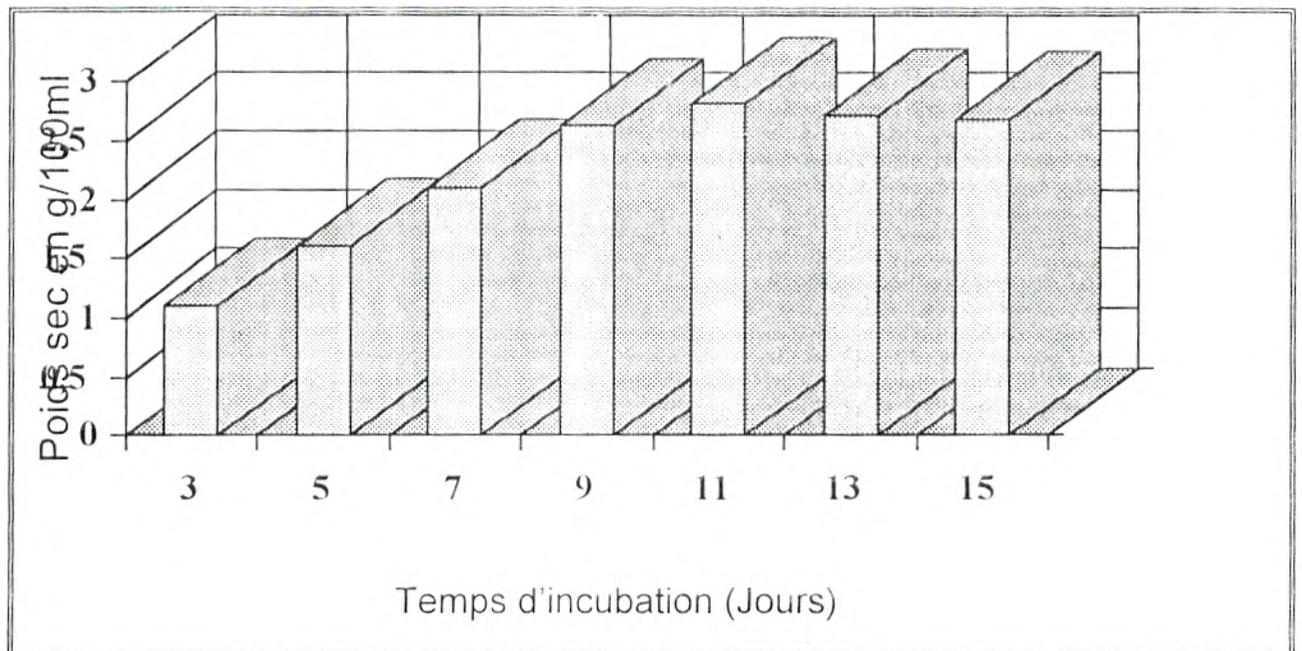


Figure 30 :Evaluation de l'activité α -amylasique de *Aspergillus niger* dans le milieu de fermentation au cours de l'incubation.

1 . 10 - Dégradation du 2,4 - D :

La figure 31 montre que la souche *Aspergillus candidus* a pu dégradée le 2,4 D présent dans le milieu jusqu'à la concentration de 1200 mg/l. Elle peut tolérer l'herbicide jusqu'à la concentration de 2400 mg/l. Au delà de cette valeur la croissance de la souche est totalement inhibée. Cependant la souche de *Penicillium chrysogenum* dégrade le 2,4 d jusqu'à la concentration de 1800mg/l et peut tolérer jusqu'à 3600 mg/l (figure 30).

1 . 11 - Dégradation du Benzène:

L'examen de ses résultats révèle d'une façon générale une diminution du poids sec des champignons suivant l'augmentation des concentration en Benzène, traduisant ainsi l'aptitude de ses champignons à utiliser ce produit comme source de carbone. Cependant les deux souches étudiées ont présenté un optimum de développement à la concentration 20 ml/l en Benzène; avec une biomasse de 1269,2 mg/100ml pour la souche *Penicillium expansium* et de 902,5 mg/100ml pour la souche *Aspergillus flavus*.

Un seuil au dessus du quelle la croissance est inhibée, est observée à la concentration de 40ml/l pour la souche *Penicillium expansium* avec une biomasse de 174,7 mg/100ml et à la concentration de 30 ml/l pour la souche *A.flavus* avec une biomasse de 353,5 mg/100ml (figure 31).

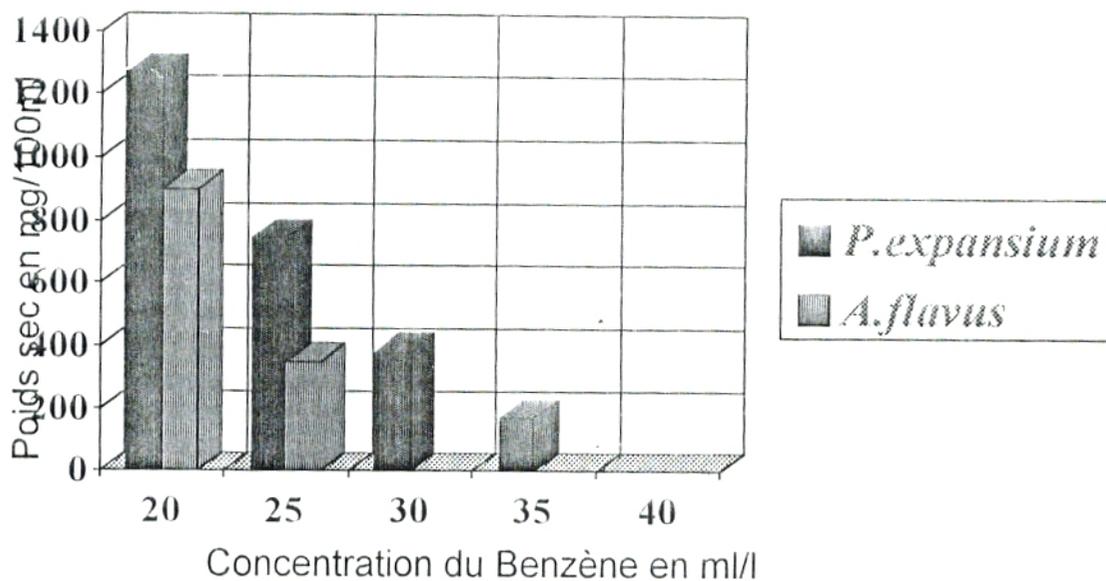


Figure 31 :Variation du poids sec en mg/100ml des deux champignons sur milieu contenant le Benzène a différentes concentrations comme source de carbone .

CONCLUSION

L'étude de l'aptitude des souches a permis de sélectionner six souches ayant une activité antibiotique et enzymatique intéressante.

- La souche SM₂ identifiée à *Aspergillus wentii* produisant un antibiotique à large spectre (antibactérien et antifongique). L'étude préliminaire de la molécule a montré qu'elle n'est pas hydrosoluble, thermostable, elle n'est pas de nature peptidique et ne contient pas de sucres ni de lipides. Une étude plus approfondie et nécessaire afin de caractériser la molécule.

Aa souche IIN₃306 apparentée à *Aspergillus niger* caractérisée par sa forte activité α -amylase. L'enzyme est extractible à l'éthanol à 95°C. L'activité de l'extrait enzymatique est 5 fois plus supérieure que dans celle du filtrat.

- Les souches IVN₃235 rattachée à *Aspergillus candidus* est la souche IVN₃333 identifiée à *Penicellium chrysogenum* dégradent le 2,4 D (herbicide) jusqu'à la concentration de 1800 mg/l et tolère des concentrations de 3600 mg/l.

- Les souches IVN₄262 et IVN₄213 classées respectivement à *Penicellium* et *Aspergillus flavus* dégradent le benzène.

CONCLUSION GÉNÉRALE

Ce travail entre dans le cadre de la connaissance de la mycoflore colonisant un milieu aquatique extrême qui est le lac l'El Golea. Pour se faire nous avons été amené à utiliser différentes techniques allant de la microbiologie à la chimie analyse physico-chimique des échantillons d'eau, isolement et identification et criblage de souches, production en milieu liquide d'antibiotique et d'enzymes, extraction et purification de molécules de différentes nature chimique.

L'exposé des résultats obtenus commence par la subdivision du lac en 4 stations (I,II,III et IV) sur la base des analyses physico-chimiques. Ces derniers ont permis d'aboutir à la reconnaissance de 2 gradients : un gradient de pollution de la station I (la plus proche de la ville) vers la station IV (la plus éloignée) et un gradient de salinité en sens inverse. Ensuite, l'analyse microbiologique des eaux des 4 stations a permis d'isoler et d'identifier 348 souches de champignons rattachées à 12 genres et 23 espèces. Les plus prédominants sont des *Aspergillus* et *Penicillium* mais les moins représentés appartiennent à *Cryosporium* et *cladosporium*. La station la plus polluée renferme le plus grand nombre de germes classés pour la plupart comme étant des halotolérants et thermotolérants contrairement à la station IV (la plus saline et la moins polluée) où quelques germes seulement survivent (halophiles et thermophiles).

Il est à noter que le nombre important de champignons retrouvés malgré le fait qu'ils sont connus comme étant acidophiles et non halophiles. Il s'agirait d'une adaptation de certains germes à ces conditions extrêmes notamment dans la station 4.

Cette étude a révélé aussi et surtout l'existence de germes reconnus comme étant soit des germes :

- pathogènes opportunistes comme *Aspergillus fumigatus* (16 souches)
- phytopathogènes comme *Fusarium* (19 souches)
- Produisant divers toxines comme *Aspergillus flavus* (13 souches).

Ces germes ce sont révélés relativement résistants à la salinité et surtout aux antifongiques habituels (travaux en cours au laboratoire). Ils peuvent poser des problèmes de santé publique d'autant plus que ces eaux renferment également une flore bactérienne et tous particulièrement des Entérobactéries, des Streptocoques des Pseudomonace et des Vibrio. La consommation du sel extrait de la station IV par la population locale ou l'utilisation de l'eau dans les abreuvoirs des animaux en sont des exemples.

A l'issue de cette partie, 23 souches ont été préselectionnées sur la base de leur halotolérance et thermotolérance.

L'étude de l'aptitude des 23 souches à produire des enzymes ou des antibiotiques a permis de retenir 6 souches intéressantes :

- La souche SM₂ identifiée à *Asprgillus wentii* produit un antibiotique dont les caractéristiques sont les suivantes : large spectre antibactérien et antifongique,