

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la

Recherche Scientifique

Université de Blida 1

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie



Mémoire de fin d'étude

En vue L'obtention du diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : biotechnologies

Spécialité : biotechnologie microbienne

Thème :

Réalisé par :

Caractérisation de la flore fongique rhizosphérique du palmier dattier et sélection des isolats producteurs d'enzymes d'intérêt biotechnologique

Présentée par :

M^{lle} Makhtour Sabrina

M^{lle} Tahar Abir

Soutenu le 17/07/2023 devant le jury composé de :

Mme N. BENOUSSAID.

Présidente M.C.A.

U. BLIDA 1.

Mme H.BENKORTEBY

Examinatrice M.A.A.

U. BLIDA 1.

Mme F. MOHAMED MAHMOUD

Promotrice M.C.A.

U. BLIDA 1.

Année universitaire 2022 – 2023

Remerciements

Nous tenons à exprimer nos vifs remerciements et notre profonde gratitude à notre promotrice madame Mohamed Mahmoud Fadhela, de nous avoir proposé de travailler avec elle sur le thème de ce mémoire et de n'avoir jamais lésiné à nous prodiguer conseils et assistance pour la bonne conception de celui-ci.

Nous remercions notre co- promoteur monsieur Megatli Mohamed qui fait tous leurs effort pour la prélèvement des échantillons au niveau de wilaya de Béchar.

Nos remerciements vont à madame Benoussaid Nacera pour avoir accepté de présider la jury et pour son soutien durant la période de stage pratique.

Nous sommes reconnaissantes à madame Benkorteby Hind, d'avoir accepté d'examiner notre travail

Nos remerciements vont à Mme Salma l'ingénieur de laboratoire (LPVRB) pour son aide ainsi que son encouragement et madame Hafidha Djalout pour leur soutien et encouragement pendant la réalisation de travail et à tous ceux qui ont contribué à la Réalisation de ce modeste travail. .

DEDICACES

- Je dédie ce modeste travail à mon père Mouhamed qui a été mon ombre durant toutes les années des études, et qui a veillé tout au long de ma vie à m'encourager, à me donner l'aide et à me protéger.
- A ma mère Halima qui m'a donné la vie, le symbole de tendresse qui s'est sacrifiée pour mon bonheur et ma réussite.
- A mes frères : Abdelhak, Toufik
- A Mes grand-parents
- A mon fiancé Farid
- A mon binôme et ma chère amie Tahar abir

Sabrina

Dédicace

Avec l'aide de dieu, le tout puissant, ce travail est achevé je dédis

- A mes précieux parents « Mohamed et Nassima » pour leur exprimer tout le respect et l'amour que j'ai pour eux et pour leur confiance leurs témoigner ma reconnaissance pour tous les efforts et sacrifices qu'ils ont entrepris à mon égard.
- A mes chères frères houssam et Rafik Et mes chères sœurs Nihad et Rihab qui je l'aime beaucoup
- A mes adorables cousines Ikram, khadidja et Naziha qui m'ont beaucoup soutenu pendant la réalisation de travail
- A mes chères collègues Sabrina abdelillah et ilyes qui sont devenus des vrai sœur et frères
- A mon homme "Djamel " qui était toujours devant moi pendant la réalisation de mémoire
- A tout mes chères familles Tahar et Elhouari a leur soutien et surtout ma petite princesse Amira
- A mes copines chahrazed Rima et insaf

ABIR

Caractérisation de la flore fongique rhizosphérique du palmier dattier et sélection des isolats producteurs d'enzymes d'intérêt biotechnologique

Résumé

Les conditions extrêmes et l'environnement saharien du palmier dattier héberge une flore fongique rhizosphérique très en enzymes d'intérêt biotechnologique. Ce travail vise d'abord à isoler et identifier des champignons du sol rhizosphérique de wilaya de Béchar et mise en évidence leur activité enzymatique qui a été réalisée au niveau du laboratoire de Protection et de Valorisation des ressources Agrobiologique (LPVRB).

L'isolement des souches fongiques a été effectué à partir de la rhizosphère de huit cultivars de palmier dattier (*Phoenix dactylifera L.*) de deux régions Taghit et Kenadsa de la wilaya de Béchar. Quarante-six isolats fongiques obtenus ont subi une caractérisation macroscopique et microscopique. La majorité des isolats obtenus proviennent du cultivar Faggous de la région de Taghit. Quatorze groupes ou morphotypes ont été classés, dont le morphotype de groupe 1 était le plus abondant. Les genres *Aspergillus* et *Penicillium* étaient les plus dominants et les autres genres de *Verticillium*, *Cladosporium*, *Rhodotorula*, *Fusarium* sont faiblement représentés.

L'activité enzymatique des dix souches fongiques sélectionnées a été réalisée sur la base des méthodes qualitatives pour déterminer leurs capacités de production d'enzymes extracellulaires (Chitinase, phosphatase, amylase, lipase, estérase, pectinase, protéase.) d'intérêt biotechnologique. Toutes les souches de genre *Penicillium* et *Cladosporium* et *Aspergillus* ont montré la capacité de production de toutes les enzymes à l'exception de la souche KMs 21 d'*Aspergillus* sp a produit que l'enzyme amylase.

Les souches fongiques rhizosphériques représentent une source prometteuse d'enzymes à large spectre d'utilisation dans plusieurs domaines.

Mot clés : isolats fongiques, enzymes extracellulaires, flore fongique, Palmier dattier, sol rhizosphérique, .

توصيف الفطرية المحيطة الجذرية لنخيل التمر واختيار العزلات المنتجة للإنزيمات ذات الأهمية التكنولوجية الحيوية

ملخص

ستضيف الظروف القاسية والبيئة الصحراوية لنخيل التمر كائنات فطرية غنية بالإنزيمات ذات الأهمية التكنولوجية الحيوية. يهدف هذا العمل أولاً إلى عزل وتحديد الفطريات من التربة الريزوسفيرية لولاية بشار وإبراز نشاطها الأنزيمي (LPVRB) الذي تم إنجازه بمختبر حماية وتثمين الموارد البيولوجية الزراعية

تم عزل سلالات فطرية من البيئة الجذرية لثمانية أصناف من نخيل التمر (*Phoenix dactylifera L.*)

من منطقتين تاغيت وكنادسة بولاية بشار ; ثم إجراء التوصيف المظهري والمجهري لستة وأربعين عزلة فطرية التي تم الحصول عليها. غالبية العزلات التي تم الحصول عليها تأتي من صنف ففوس من منطقة تاغيت. تم تصنيف أربعة عشر *Aspergillus* □ *Penicillium* مجموعة أو نمط شكلي، وكان النمط الشكلي للمجموعة 1 هو الأكثر وفرة، لكن أجناس *Vertisilium* □ *Cladosporium* *Rhodotorula*، *Fusarium* الأكثر سيطرة، وكانت الأجناس

ممثلة بشكل ضعيف

تم تنفيذ النشاط الأنزيمي للسلالات الفطرية العشر المختارة على أساس الطرق النوعية لتحديد قدراتها الإنتاجية من الإنزيمات ذات فعالية خارجية (الكيتيناز، الفوسفاتاز، الأميلاز، الليباز، الإستراز، البكتيناز، البروتياز)، ذات الأهمية التكنولوجية الحيوية. أظهرت جميع سلالات *Aspergillus* و *Cladosporium* و *Penicillium*

القدرة على إنتاج جميع الإنزيمات باستثناء سلالة *Aspergillus* sp KMs 21. التي أنتجت فقط إنزيم الأميلاز

تمثل السلالات الفطرية محيط الجذور مصدرًا واعدًا للإنزيمات ذات نطاق واسع من الاستخدام في العديد من المجالات

الكلمات المفتاحية: العزلات الفطرية، الإنزيمات ذات فعالية خارجية، الكائنات الفطرية، نخيل التمر، التربة محيط الجذور

Characterization of rhizospheric fungal flora of date palm and selection of isolates producing enzymes of biotechnological interest

Abstract

The extreme conditions and Saharan environment of the date palm harbor a rhizospheric fungal flora rich in enzymes of biotechnological interest. The aim of this work is to isolate and identify rhizospheric soil fungi from the wilaya of Béchar and highlighted their enzymatic activity, which was carried out at the Laboratoire de Protection et de Valorisation des ressources Agrobiologique (LPVRB).

The fungal strains were isolated from the rhizosphere of eight date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cultivars from the Taghit and Kenadsa regions of the Béchar wilaya; forty-six fungal isolates were subjected to macroscopic and microscopic characterization. The majority of isolates obtained were from the Faggous cultivar from the Taghit region. Fourteen groups or morphotypes were classified, of which the group 1 morphotype was the most abundant; the genera *Aspergillus* and *Penicillium* were the most dominant, and the other genera *Vertisilium*, *Cladosporium*, *Rhodotorula*, *Fusarium* were weakly represented.

The enzymatic activity of the ten fungal strains selected was carried out using qualitative methods to determine their capacity to produce extracellular enzymes (chitinase, phosphatase, amylase, lipase, esterase, pectinase, protease) of biotechnological interest. All *Penicillium*, *Cladosporium* and *Aspergillus* strains were able to produce all the enzymes, with the exception of *Aspergillus* sp strain KMs 21, which produced only the amylase enzyme.

Rhizospheric fungal strains represent a promising source of broad-spectrum enzymes for use in a number of fields.

Key words :fungal isolates, extracellular enzymes, fungal flora, date palm, rhizospheric soil.

Liste des abréviations

A : Aspergillus

P : Pénicillium

F : Fusarium

PDA : Potato Dextrose Agar

PVK: Pikovskaya

GYP: Glucose Yeast Extract Peptone

Sp : espèce

UFC : Unité Formant Colonie

Table des matières

Introduction	1
Chapitre I : Synthèse bibliographique sur le palmier dattier, la flore fongique rhizosphérique et les enzymes fongiques	
I.1 généralistes du palmier dattier (<i>Phoenix dactylifera</i> L.).....	4
I.1.1.Intérêt de palmier dattier	4
I.2. La flore fongique rhizosphérique	4
I.3.Les enzymes fongiques d'intérêt biotechnologique	6
Chapitre II : Partie Expérimentale	
II. Matériel et méthodes	11
II.1. Matériel	11
II.1.1. Matériel biologique	11
II.1.2. Matériels non biologiques	12
II.2. Méthodes	13
II.2.1. Isolement des champignons du sol rhizosphérique de palmier dattier	14
II.2.2. a) Dénombrement de la flore totale rhizosphériques.....	15
II.2.2. b) Dénombrement de la flore totale par variété et par région.....	15
II.2.3.Dénombrement de la flore fongique rhizosphérique	15
.....16	
II.2.4.Purification des souches fongiques	16
II.2.5.Identification macroscopique et microscopique des isolats fongiques	16
II.2.5.1.Identification macroscopique	16
II.2.5.2.Identification microscopiques	16
II.3.Conservation des souches fongiques	16
II.4. .Activité enzymatique	17
II.4.1.Chitinase	18
II.4..2.Phosphatase	18
II.4.3.Pectinase	18
II.4.4.Amylase	18
II.2.6.5.Protéase	19

II.2.6.6. Lipase	19
II.2.6.7. Estérase	19

Chapitre III : Résultats et discussions

III.1. Dénombrement de la flore totale rhizosphérique	19
III.2. Dénombrement de la flore fongique	21
III.2. Identification macroscopique et microscopique de la flore fongique rhizosphérique	21
III.2.1. Identification macroscopique	21
III.2.2. identification microscopique	27
III.3. Activités enzymatiques	32
III.3.1. Activité chitinasique	32
III.3.2. Activité amylolytique	34
III.3.3. Activité pectique	35
III.3.4. Activité lipasique	37
III.3.5. Activité estérasique	39
III.3.6. Activité protéolytique	40
III.3.7. Activité phosphatasique	42

Liste des figures

Numéro figure	Titre de figure	Page
1	Différentes étapes d'isolements du sol rhizosphérique du palmier dattier	13
2	Différentes étapes d'isolements du sol rhizosphérique du palmier dattier	15
3	Caractérisation macroscopique et microscopique de TBs33 (<i>Aspergillus niger</i>) (G×40)	27
4	Caractérisation macroscopique et microscopique de KTs31 <i>Aspergillus terreus</i> . (G×40).	27
5	Caractérisation macroscopique et microscopique de TBs21 <i>Fusarium</i> sp (G×40)	27
6	Caractérisation macroscopique et microscopique de TBs22 <i>Verticillium</i> sp. (G×40).	28
7	Caractérisation macroscopique et microscopique de KFs232 <i>Aspergillus</i> .sp (G×40)	28
8	Caractérisation macroscopique et microscopique de TFs38 <i>Penicillium</i> sp. (G×40) .	28
9	Caractérisation macroscopique et microscopique de TFs34 <i>Cladosporium</i> sp (G×40).	29
10	Caractérisation macroscopique et microscopique de TRs31 <i>Rhodotorula</i> sp,(G×40)	29
11	Caractérisation macroscopique et microscopique de KMs21 <i>Aspergillus</i> sp(G×40)	29
12	Caractérisation macroscopique et microscopique de KFs22 <i>Aspergillus</i> sp (G×40)	30
13	Caractérisation macroscopique et microscopique de TCs33 <i>Penicillium</i> sp (G×40)	30
14	Caractérisation macroscopique et microscopique KFs21 <i>Aspergillus</i> sp (G×40).	30
15	Caractérisation macroscopique et microscopique de TCs33 <i>Penicillium</i> sp (G×40)	30
16	Caractérisation macroscopique et microscopique de TBs21 <i>Fusarium</i> sp. (G×40)	31
17	Figure indiquant le nombre de souche par genre testé	32
18	Activité chitinasique des souches fongiques testées.	33
19	Activité amylolytique des souches fongiques testées.	35

20	Activité pectique des souches fongiques testées.	36
21	Activité lipasique des souches fongiques testées.	38
22	Activité estérasique des souches fongiques testées.	40
23	Activité protéolytique des souches fongiques testées.	41
24	Activité phosphatasique des souches fongiques testées.	43
25	Aptitude enzymatique des meilleurs genres de souches testées.	44

Liste des tableaux

Numéro du tableau	Titre	Page
1	Codification les échantillons étudiées des deux régions (Taghit et Kenadsa)	11
2	Le matériel non biologique	12
3	Dénombrement de la flore totale (fongique et bactérienne) du sol rhizosphérique.	19
4	Dénombrement de la flore totale par variété et par région.	20
5	Nombre d'isolats fongiques	21
6	Identification macroscopique de groupe 01	22
7	Identification macroscopique de groupe 02	23
8	Identification macroscopique de groupe 03	23
9	Identification macroscopique de groupe 04	24
10	Identification macroscopique de groupe 05	25
11	Identification macroscopique de groupe 06	25
12	Identification macroscopique de groupe 07	25
13	Identification macroscopique des morphotypes représenté par un seul isolat (Groupe 08 à 14)	26
14	Résultats de l'activité chitinasique des souches testées	33
15	Résultats de l'activité amylolytique des souches testées	34
16	Résultats de l'activité pectique des souches testées	36
17	Résultats de l'activité lipasique des souches testées	37
18	Résultats de l'activité estérasique des souches testées	39
19	Résultats de l'activité protéolytique des souches testées	41
20	Résultats de l'activité phosphatasique des souches testées	42

Introduction

Introduction

Les champignons sont les principaux groupes présents dans le sol qui constituent une biomasse très importante au niveau de la rhizosphère à côté des bactéries (Chandini et Rajeshwari, 2017). Ils sont des microorganismes eucaryotes, unicellulaires, filamenteux, hétérotrophes, immobiles. De différents genres comme : *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Mucor*, *Trichoderma*... etc. .. Leurs populations sont conditionnées par la richesse du sol en matière organique, qui jouent un rôle fondamental dans l'écologie de la planète (Frac et al., 2018).

La flore fongique rhizosphérique constitue une liaison complexe qui utilise les nutriments libérés par la plante hôte et établit une plateforme pour des réactions complexes entre la plante et son environnement. La rhizosphère est un facteur crucial qui affecte les relations entre les plantes, les sols et les microorganismes (Fernandez et al., 2019).

Selon Radi et al. (2014), le palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) est approprié aux sols de composition très divers, qui composent les terres dans les régions sahariennes, est constitué le pilier principal de l'écosystème oasien. Cet environnement hostile constitue une source de flore fongique intéressante possédant un métabolisme très varié. Ce métabolisme est capable de synthétiser plusieurs métabolites, parmi eux les enzymes extracellulaires qui possèdent une importance remarquable que ce soit pour la plante hôte ou bien après leurs extractions et utilisations dans d'autres domaines.

Les enzymes sont des biocatalyseurs de processus naturels, elles sont spécifiques, elles jouent un rôle essentiel qui contrôlant les procédés métaboliques permettant aux nutriments d'être transformés en énergie et en matériaux cellulaires, et privilégiées en industrie car elles permettent de contourner les inconvénients des produits chimiques et améliorent les relations coûts-efficacité des procédés (Sandhya et al., 2005). Elles sont anciennes dans les domaines biotechnologiques principalement dans le secteur de la production alimentaire.

Les enzymes fongiques sont largement utilisées dans les différentes industries à cause de certains avantages tels que la productivité élevée à faible coût (Singh et al., 2019). Leur production peut se faire en consommant un substrat bon marché qui sert de source de carbone, et leurs exigences de purification et de séparation sont plus faciles ce qui aboutit à une réduction de la consommation d'énergie et du temps de travail (Jyostna et al., 2019).

Dans ce contexte, se base l'objectif de cette étude nous nous intéressons à l'étude de la flore fongique rhizosphérique du palmier dattier puis sélectionné des isolats producteurs d'enzymes d'intérêt biotechnologique . Le travail commencer par un isolement et une caractérisation de la flore fongique du sol rhizosphérique de huit variétés du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) situées dans deux régions Taghit et Kenadsa de la Wilaya de Bechar du sud d'Algérie. Après purification, les champignons ont subi une identification macroscopique et microscopique pour identifier quelque genre. Enfin des tests d'activités enzymatiques ont été réalisé pour sélectionner les souches productrices d'enzymes extracellulaires étudiés.

Chapitre I :

Synthèse bibliographique

I.1 Généralités du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.)

Le palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) est une plante monocotylédone diploïde (purayilet *al.*, 2019). dioïque de la famille des *Arecaceae*, ce sont des plantes parmi les plus anciennes, cultivée depuis plus de 6 000 ans, principalement pour ses fruits (Zango et *al.*, 2017). le système racinaire du palmier dattier se développe entre 12 et 20 m de profondeur. La morphologie de palmier dattier est constituée par les racines qui présentent quatre zones déférents (respiratoire, nutrition, d'absorption, et d'absorption profonde), et le tronc et le premier (Munier., 1973).

I.1.1. Intérêt de palmier dattier

Le palmier dattier contribue d'une manière significative à la subsistance de l'écosystème désertique. Il lutte contre la désertification et module les températures macro- et microclimatiques. Il protège également le sol de différents types de dégradation. Le palmier dattier constitue l'axe principal de l'agriculture, soit l'une des cultures fruitières les plus prospères dans les régions arides, semi-arides, tropicales et subtropicales. protège l'oasis contre les influences du désert. L'oasis par son microclimat est un milieu favorable à l'agriculture saharienne, à la flore et à la faune. Il joue le rôle d'ombrage à différentes autres cultures par son aspect parasol et son dégagement au sol permettant la cohabitation de l'espace par d'autres végétaux : arbres fruitiers et cultures herbacées diverses.

La taxonomie de *Phoenix dactylifera* L., (Annexe 1). (Cronquist., 1991)

I.2. La flore fongique rhizosphérique

Le sol est considéré comme une ressource naturelle non renouvelable pour sa qualité et sa fertilité, à la base du fonctionnement de l'environnement naturel (Keesstra et *al.*, 2018). Les micro-organismes constituent l'un des facteurs clés du maintien de la qualité et de la santé des sols. Ils sont impliqués dans la transformation des composés chimiques, contribuent non seulement à fournir des nutriments disponibles aux plantes, mais servent également à promouvoir leur croissance et leur développement (Doni et *al.*, 2014).

La rhizosphère est une zone étroite du sol qui entoure les racines d'une plante et qui est fortement influencée par les exsudats racinaires. La rhizosphère est la région la plus active pour

l'échange de matière et d'énergie et joue un rôle essentiel dans la circulation des nutriments dans le sol (Li et al., 2018).

Selon McNear (2013), la rhizosphère est structurée par trois zones différentes : l'endorhizosphère, le rhizoplan et l'ectorhizosphère. La communauté microbienne associée aux plantes comprenant des microorganismes connus et d'autres inconnus qui vivent dans cette zone du sol (Edwards et al., 2015).

Le sol rhizosphérique du palmier dattier dans le Sahara algérien contenant une diversité fongique des genres dont certains sont phytopathogènes, tels que *Fusarium oxysporum* sp, et le genre *Beauveria bassiana* intervenant dans la lutte biologique (Mohamed Mahmoud, 2017).

Selont Mandyam et al (2005) La flore fongique du sol constituent une alternative moins coûteuse et certainement plus efficace, surtout pour des zones semi arides et arides dans la Sahara. Ils peuvent montrer des effets positifs sur la plante hôte, comme la résistance et la tolérance aux stress biotiques et abiotiques .

Les mycètes du sol englobes des levures, des champignons supérieurs et surtout des moisissures des genres *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Mucor*, *Trichoderma*, *Verticillium*, *Cladosporium* (Dommergues, 1970). Leurs populations conditionnées par la richesse du sol en matière organique. La grande majorité des champignons sont saprophytes, mais un bon nombre d'espèces sont des parasites redoutables (Sablonnier, 2002). La microflore tellurique mènent des contacts intraspécifiques entre les membres de la même espèce et interspécifiques avec les autres individus de la biocénose tellurique. Ces relations peuvent être bénéfiques comme elles peuvent être néfastes. Il existe certains champignons qui peuvent être phytopathogènes ou provoquent des mycoses chez les animaux (Lutzoni et al., 2004).

-Les saprophytes

Les champignons saprophytes prélèvent leurs nutriments à partir de la matière organique morte, ils absorbent ces éléments grâce à l'évacuation d'enzymes extracellulaires. Ils jouent un rôle essentiel dans les cycles biologiques où ils minéralisent et décomposent la matière animale ou végétale morte (Hallsworth, 2018).

-Les parasites

Le parasitisme est un facteur de stress énergétiquement coûteux pour les hôtes, les champignons sont soit des parasites obligatoires, facultatifs ou opportunistes, délétères pour l'hôte se caractérise par la capacité d'un individu de règne Fungi, à tirer des éléments nutritifs

provenant d'un autre organisme. Quatre vingt dix % des maladies des plantes sont causées par des champignons. Éventuellement nécrotrophes ou biotrophes (Canard et *al.*, 2016)

-Les symbiotiques

La relation des champignons symbiotique se fait dans le même milieu avec un autre organisme vivant . par exemple : l'association des champignons mycorhiziens aux plantes qui implique des échanges nutritionnelle entre les champignons et leurs hôtes. Les symbiotes ectomycorhiziennes sont reconnues pour l'amélioration de la résistance aux pathogènes, de l'absorption de l'eau et de la résistance aux stress abiotiques chez l'hôte

-Les phytopathogènes Les phytopathogènes lorsqu'ils entrent en contact avec les plantes, leur métabolisme est initié par des réactions physiologiques, biochimiques et moléculaires de surface ainsi que la transmission de signaux, ils diminuent le rendement et la qualité des cultures et causent d'énormes pertes dans la production agricole (Félix et al., 2019 ; Vincent et al., 2020).

I.3. Les enzymes fongiques d'intérêt biotechnologique

Les enzymes fongiques sont des biocatalyseurs stables et efficaces ; leur production est rapide et élevé , ils consomment moins d'énergie (Majsov, 2016), Ils présentent chez les champignons filamenteux (Kalia, S *et al.*, 2021). Les enzymes les plus importants dans le secteur biotechnologique sont : les chitinases, les lipases, les amylases, les estérases, les pectinases, les protéases et les phosphatases.

-Les chitinases

Les chitinases sont des glycosyl hydrolases (GH) dont le mécanisme catalytique implique l'hydrolyse de la liaison β -1-4 dans le polymère N-acétyl-D-glucosamine de la chitine qui résiste à la dégradation. C'est un composé des parois cellulaires des champignons filamenteux et un composé structurel majeur des pathogènes contenant de la chitine (Renner,2012 ; Jain et *al.*,2019). Ils sont divisés en deux groupes :l'endochitinase et l'exochitinase, en fonction de leurs mécanismes de clivage et d'hydrolyse (Tyler et *al.*, 2010). Les sources fongiques reconnu pour avoir une synthèse de l'enzyme de chitinase sont :*Beauveria bassiana*, , *Saccharomyces cerevisiae*, *Coprinopsis cinerea*, *Trichoderma* , *Metarhizium*, et il joue également un rôle crucial en biotechnologie par la production de chito oligosaccharides et les GlcNAc grâce à *Penicillium monoverticillium* , *Aspergillus* , *Fusarium oxysporum* (Zhou et al., 2018) . D'après Deng et al. (2019) ont démontré que la chitinase de

Trichoderma harzianum inhibait efficacement la croissance du champignon phytopathogène après la récolte dans le biocontrôle, récupération de la tannase à partir d'*Aspergillus niger* (Lekhaet Lonsane 1994).

Les lipases Les lipases appartiennent à la famille des triacylglycérols esters hydrolases (EC 3.1.1.3). elles peuvent catalyser l'hydrolyse et la synthèse des triglycérides à longue chaîne en acides gras, diacylglycérol, monoacylglycérol et glycérol, connus sous le nom de carboxylestérases (Moraleda et al., 2007). Elles synthétisent des esters à partir du glycérol et des acides gras à longue chaîne en milieu non aqueux (Ergan et al., 1990). Elles sont produites par divers organismes microbiennes plus spécialement les champignons: *Trichoderma*, *Penicillium chrysogenum* ; *Aspergillus niger* produit des lipases en plus grande quantité (Skoczinski et al., 2017). Ils sont utilisés dans l'industrie agro-alimentaire, surtout concernant le développement de saveur pour les laitier fermentés : fromage, beurre, margarine, et les boissons alcoolisées, boulangerie, en biscuiterie (Najjar, 2010). Elles interviennent dans la maturation des fromages (Bharathi et al., 2019).

Les estérases Les estérases (EC. 3.1.1.1 - carboxylestérases) sont largement répandues chez les animaux, les plantes et les micro-organismes, mais dont les fonctions physiologiques sont mal définies (Beisson et al., 2000). Ces enzymes sont des hydrolases (carboxylésterases) dont les applications sont importantes en raison de leur grande stabilité, en particulier dans les solvants organiques (Bornscheuer et Kazlauskas, 2006 ; Liese et al., 2006), sont disponibles dans le commerce et utilisées dans la synthèse de composés optiquement actifs de lipides et de détergents domestiques (Schmidt et Bornscheuer, 2005). La source fongique de production d'estérase est : *Trichoderma* sp., *Aspergillus niger*, *Penicillium* sp., *Saccharomyces cerevisiae*. En biotechnologies, il est utilisée pour les produits laitiers, boissons alcoolisées, les vêtements, l'agrochimie (herbicides, insecticides), la bioremédiation, le développement de biocapteurs, les anticancéreux, les antitumoraux, la thérapie génique et à des fins de diagnostic réf.

- Les phosphatases

Les phosphatases sont des enzymes produites par les bactéries, les champignons et les racines des plantes et servent à couper un groupe phosphate de leurs substrats, transformant des formes complexes et parfois indisponibles de phosphate organique en phosphate assimilable. Ils catalysant l'hydrolyse des esters et des anhydrides de l'acide phosphorique. Ils peuvent également être subdivisées en fonction de leur régulation. Les espèces fongiques qui synthétisent la phosphatase sont : *Aspergillus niger*, *A. flavus*, *A. candidus*, *A. niger*, *A. terreus*,

A. wentii, *Fusarium oxysporum*, *Penicillium* sp., *Trichoderma* sp., *Trichoderma isridae* (Yoshida et al., 1989). L'intérêt majeur de phosphatase en agriculture est la fertilisation et la solubilisation de phosphate dans le sol.

-Les amylases Les amylases (EC.3.2.1.x) sont des enzymes d'hydrolases, et endoglycanases. Elles agissent sur les liaisons (1-4) de l'amidon. Ils catalysent la dégradation des polymères d'amidon pour produire des dextrines et différents gluco-oligosaccharides (Gupta et al., 2003). Leur source fongique : *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Rhizopus oryzae*, *Penicillium* sp., *Alternaria alternata* (Ertan et Balkan, 2007) . Les amylases sont plus importantes en biotechnologie, elles représentent environ 25 à 33% du marché mondial d'enzymes (Saxena et al., 2007). En raison de l'importance industrielle de cette enzyme, un intérêt est porté à l'isolement de nouvelles amylases appropriées aux applications industrielles nouvelles (Burhan et al., 2003). En raison de leur productivité et leur thermostabilité, les amylases sont largement utilisées dans l'industrie alimentaire, textile, papeterie, et la formulation des détergents (Prakash et Jaiswal, 2009). Dans l'industrie pharmaceutique, les amylases sont utilisées comme agent anti inflammatoire et aussi comme aide digestif pour éviter les dyspepsies, les fermentations intestinales et la production d'alcool et du biocarburant.

-Les protéases Les protéases sont des enzymes qui catalysent l'hydrolyse des protéines, entre la liaison peptidique qui relie deux acides aminés dans la chaîne peptidique qui présente la sous classe 4 de la classe 3 d'hydrolases (EC3.4.) (Mala et al., 1998 ;Kumar et al., 2008). Il y'a deux groupes, les extracellulaires et les intracellulaires. Les sources fongiques sont *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus clavatus*, *Mucor circinelloides*, *Conidiobolus coronatus*, *Penicillium* sp. , *Bauveria felina* (Sathya et al., 2009). Les protéases sont les plus employées en biotechnologie, elles sont très recherchées dans la bio-industrie pour la production des produits pharmaceutiques comme agents anticancéreux, anti-inflammatoires, la synthèse des peptides, le traitement du cuir : battage, déshuilage, tannage (Sahoo et al., 2012). Dans l'industrie alimentaire est utilisé dans l'amélioration de la récupération de l'huile dans les fruits de mer, la modification des protéines alimentaires pour améliorer la valeur nutritionnelle, la solubilité, la digestibilité, le goût, la palatabilité et la réduction des composés allergènes ainsi que pour augmenter le volume et la texture du pain et de la viande (Singh et al., 2016).

-Les pectinases Les pectinases sont des enzymes caractérisées par leurs pouvoir de dégradation de la pectine (Martinez-Trujillo et al., 2011). Elles forment un groupe unique,

complexe et hétérogène de différentes enzymes agissant spécifiquement sur les substrats pectinolytiques, notamment les polymères de pectine. Les polysaccharides majeurs dans les parois cellulaires. Leurs sources fongiques: *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus*, *Rhizopus*, *Mucor*, *Penicillium*, *Trichoderma* (Priya et Sashi, 2014). Dans le secteur biotechnologique, les pectinases occupent 25 % dans le marché mondial par l'alimentation et les boissons (Fadi et al ., 2019). Elle agit comme catalyseur biologique attrayant dans les industries en réalisant l'extraction et la clarification des jus de fruits et l'administration de médicaments dans les industries pharmaceutiques, processus de dégommage/retrait des fibres végétales dans les industries textiles. Elle accélère la fermentation du thé et élimine l'enveloppe mucilagineux (Shet et al ., 2018), et le traitement des eaux usées .

Chapitre II

Matériels et méthodes

Le présent travail a été réalisé au niveau du laboratoire de Protection et de Valorisation des ressources Agrobiologique (LPVRB) de la faculté SNV université Saad Dahleb de Blida 1. La partie expérimentale a été effectuée en deux étapes ; la première étape est consacrée à l'isolement et l'identification des champignons du sol rhizosphérique de huit variétés de palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.), de deux régions de Taghit et Kenadsa de la wilaya de Bachar. La deuxième étape est réservée à la recherche des isolats fongiques producteurs de certaines enzymes à intérêt biotechnologique.

II.1. Matériel

II.1.1. Matériel biologique

Le sol rhizosphérique de huit cultivars de palmier dattiers prélevé à partir de deux régions de la wilaya de Béchar représente le matériel biologique. La première région de Taghit (Biskra, Faggous, Cherka, Ras Elle Hmar), et la deuxième région de Kenadsa (Hmira, Tinaser, Faggous, Hamria) (**Tableau 1**). Dans la zone la plus riche en racines à une profondeur de 45 cm, trois échantillons de chaque cultivars ont été prélevés regroupés et homogénéisés pour obtenir un seul échantillon représentant de chaque cultivar..

Tableau 01 :Codification des échantillons étudiées des deux régions (Taghit,et Kenadsa)

Région de Taghit			
Chiffre	Cultivar	Age	Codification
01	Biskra	02 ans	TB
02	Faggous	10 ans	TF
03	Cherka	20 ans	TC
04	Ras Elle Hmar	25 ans	TR
Région de Kenadsa			
Chiffre	Cultivar	Age	Codification
01	Hmira	20 ans	KH
02	Tinaser	20 ans	KT
03	Faggous	19 ans	KF
04	Hamriya	35 ans	KM

II.1.2. Matériels non biologiques

Tableau 02 : Le matériel non biologique

Verrerie	Solutions	Produits chimiques
tubes à essai, boîte Pétri, Pipette pasteur, Bicher, entonnoir, erlenmeyer,	Tween 20, tween 80, éthanol, L'eau distillée stérile	milieu de culture Potato Dextrose Agar (PDA), Agar, peptone, extrait de levure, Glucose (C ₆ H ₁₂ O ₆), amidon (C ₆ H ₁₀ O ₅) _n , gélatine, chitine, Bleu de bromophénol (C ₁₉ H ₁₀ Br ₄ O ₅ S), pectine, sulfate d'ammonium (NH ₂) ₂ SO ₄ , phosphate bicalcique (Ca ₂ PO ₄), chlorure de potassium (KCl), magnésium sulfate heptahydrate (Mg SO ₄ 7H ₂ O), sulfate de manganèse (II) (MnSO ₄), sulfate de fer(II) (FeSO ₄), ,sodium phosphate dibasique (Na ₂ HPO ₄), phosphate de potassium monobasique (KH ₂ PO ₄), chlorure d'ammonium (NH ₄ Cl), chlorure de sodium (NaCl), chlorure de calcium dihydrate (CaCl ₂ 2H ₂ O).

II.2. Méthodes

II.2.1. Isolement des champignons du sol rhizosphérique de palmier dattier

L'isolement des champignons du sol rhizosphérique du palmier dattier de huit variétés des deux régions de Taghit et kenadsa, a été réalisé après son mélange et homogénéisation. Une série de tubes de 9 ml de l'eau distillée stérile ont été préparés et 1 g de sol de chaque cultivateur de deux régions a été mesuré. Ces quantités du sol de chaque variété ont été déposées dans les tubes à essai. Après homogénéisation à l'aide d'un vortex pendant 20 minutes, des séries de suspensions dilutions de 1/10 ont été préparés jusqu'à la dilution 10⁻⁵. A l'aide d'une seringue, un volume de 0,5 ml des dilutions de 10⁻² et 10⁻⁴ estensemencé dans chaque boîte de Pétri contenant le milieu PDA (Potato Dextrose Agar) (Johnston et Booth, 1982) (code (TB -2, TB -4, TF -2, TF-4 etc.); Trois répétitions de chaque dilution ont été préparés. Pour bien étaler les suspension dans les boîtes de Pétri, des billes en verre ont été utilisées.

L'incubation des boîtes à été effectuée à 27°C pend sept jours (Figure 1).



Figure 01: Différentes étapes d'isolement des champignons du sol rhizosphérique de palmier dattier

II.2.2. a) Dénombrement de la flore totale rhizosphériques

Nous avons compté les colonies de la flore microbienne (bactéries, champignons) total présente dans les boîtes de Pétri après l'incubation.

II.2.2. b) Dénombrement de la flore totale par variété et par région.

L'Unité Formant Colonie (UFC) a été calculée par la moyenne de nombre de colonie de dilution 10^{-2} , Pour avoir le dénombrement de 1g de sol contenant dans la dilution 10^{-1}

II.2.3. Dénombrement de la flore fongique rhizosphérique

Après incubation une observation macroscopique des boites de Pétri est réalisée. Les colonies fongiques appaiaient sur les boites de Pétri ont été sélectionnée (TBs41, TBs42, TBs43, TFs43, TCs43, TRs41, TRs43, KHS41, KHS43, KTs43, KFs21, KFs42), KFs43, KMs23, KMs42, KMs43.1

II.2.4. Purification des souches fongiques

La purification des champignons rhizosphériques a été effectuée grâce à une série de repiquage des disques mycéliens déposés au centre dans des boîtes de contenant le milieu de culture Potato Dextrose Agar (PDA), et mise en incubation à 27°C pendant 7 jours afin d'obtenir des cultures pures.

II.2.5. Identification macroscopique et microscopique des isolats fongiques

II.2.5.1. Identification macroscopique

L'étude morphologique des isolats fongiques a été réalisée à l'œil nu en se basant sur les caractères suivants : l'aspect des colonies (floconneuse, poudreuse, granuleuse, cotonneuse) ; la couleur (face et revers de la boîte de Pétri), la texture des colonies, présence ou absence des pigments, la forme du contour (filamenteux, régulier, dentelé...)

II.2.5.2. Identification microscopiques

La caractérisation microscopique des champignons est réalisée à l'aide d'un microscope optique. Sur les caractères suivants : l'aspect du mycélium, la forme des spores ou des conidiés, la présence ou l'absence des chlamydo-spores, les champignons ont été affiliés au genre, espèces ou en morphotype (Watanabe, 1937; Dufresne, 2021)..

II.3. Conservation des souches fongiques

La conservation a été faite pour conservée les champignons à courte pour les épindorffs et à longue durée pour les enveloppes, qui caractériser par deux méthodes ont été réalisées. La première consiste à effectuer un repiquage de chaque champignon dans des boîtes de Pétri contenant le milieu PDA et quatre morceaux de papier filtre stériles, Deux répétitions ont été réalisées. Après 5 à 7 jours d'incubation, les papiers contenant les champignons ont été prélevés et déposés dans des boîtes de Pétri vide stériles pour les sécher dans un dessiccateur. Après une période de un mois à peu près les papiers filtres séchés sont déposés dans des petites enveloppes stérilisées au préalable à l'autoclavage codées et sceller avec du scotch et conservés à une température de -20°C. La deuxième méthode consiste à déposer les morceaux d'agar contenant les champignons dans des épindorffs stériles codés et fermés avec du parafilms, codés et conservés à -20°C.



Figure 02 : Différentes étapes de conservation les isolats fongiques .

II.4.Activité enzymatique

Dix souches fongique représentant de chaque groupe ont été sélectionnées pour déterminer leurs activités enzymatiques. Sept enzymes ont été recherchées ; la chitinase, la pectinase, la phosphatase, l'amylose, la protéase, la lipase et ,l'estérase, basé sur des techniques qualitatives par l'utilisation des milieux solide différents .

II.4.1.Chitinase

Le test qui indique l'activité de chitinase a été réalisé sur le milieu PDA, modifié avec remplacement du glucose par la chitine (Annexe A). Les disques mycéliens ont été déposés au centre des boites de Pétri contenant le milieu à raison de trois répétitions pour chaque souche. Une boite sans champignon sert comme témoin. Toutes les boites sont incubées à 27°C pendant 5 jours. La bonne croissance des souches fongiques dans ce milieu indique une réaction positive signifie la production de chitinase

II.4.2.Phosphatase

Le test de solubilisation du phosphate a été réalisé sur le milieu Pikovskaya (PVK) bicalcique solide, modifié par l'addition de 0,2 g de bleu de bromophénol(Annexe E). Des disques mycéliens, issus de pré-cultures fraîches, sont repiqués dans des boîtes de Pétri contenant le milieu PVK, à raison de trois répétitions pour chaque souche fongique. Une boîte de Pétri contenant le milieu sans champignon sert comme témoin. Les boîtes sont incubées à 27°C pendant 5 à 7 jours. La formation d'halo claire ou la décoloration du milieu PVK autour de la colonie est un indicateur de catalisation ou solubilisation du phosphate

II.4.3.Pectinase

Selon Cattelan et *al.* (1999), le test qui indique la production pectinasique des champignons se fait sur le milieu M9 agar, additionné de 10g de pectine, de 1,2g d'extrait de levure et de 0.2 g de bleu de bromophénol (Miller, 1974),(Annexe C). Les disques mycéliens ont été déposés sur le milieu gélosé, à raison de trois répétitions par souche et une boîte sans champignon sert comme témoin. Les boîtes sont incubées à 27°C pendant 2 à 3 jours. La bonne croissance des souches fongiques indique une réponse positive pour la production de pectinase

II.4.4.Amylase

La production de d'amylase a été réalisée par le milieu GYP (Glucose Yeast Extract Peptone) décrit par Maria et *al.* (2005), auquel 2g d'amidon soluble ont été ajouté(Annexe B), des disques mycéliens sont inoculés dans des boîtes de Pétri contenant ce milieu, en raison de trois répétitions pour chaque souche et une boîte sans disque sert comme témoin. L'incubation se fait à 27°C pendant 3 à 5 jours. L'activité amylolytique a été démontrée après inondation des boîtes avec la solution de lugol. L'apparition de la zone claire formée autour de la colonie révèle la dégradation de l'amidon par l'enzyme amylase.

II.4.5.Protéase

Le test de protéase a été réalisé sur le milieu GYP (Maria et *al.*, 2005), additionné de 0,4% de gélatine et 2ml de bleu de bromophénol(Annexe B).Les disques mycéliens sont déposés dans des boîtes de Pétri contenant ce milieu, à raison de trois répétitions pour chaque souche, une boîte sans disque mycélien sert comme témoin. Après incubation à 27°C pendant 7 à 8 jours, les plaques ont été inondées avec du sulfate d'aluminium aqueux. La présence d'un halo clair ou une précipitation autour des colonies indique une activité protéolytique.

II.4.6. Lipase

Selon Maria et *al.* (2005), la production de lipase a été effectuée par l'utilisation du milieu Peptone Agar additionné par 2 ml de bleu de bromophénol, le tween 20 stérilisé préalablement a été ajouté (1 ml pour 100 ml du milieu) par l'utilisation des microfiltres (Annexe D). Les disques mycéliens sont déposés dans les boîtes contenant ce milieu, à raison de trois répétitions par souche et une boîte sans souche sert comme témoin. L'incubation des boîtes se fait à 27°C pendant 3 à 5 jours. La présence d'un halo clair ou une précipitation indique une réponse positive pour la production de lipase.

II.4.7. Estérase

L'activité estérasique a été faite en utilisant le milieu Peptone Agar décrit par Carrim et *al.* (2006), auquel le tween 80 stérilisé séparément par microfiltration (1 ml pour 100 ml du milieu) et 2 ml de bleu de bromophénol ont été ajoutés (Annexe D). Les disques mycéliens sont déposés dans des boîtes contenant ce milieu, à raison de trois répétitions par souche et une boîte sans champignon sert comme témoin. L'incubation des boîtes se fait à 27°C pendant 3 à 5 jours. La présence positive d'une éventuelle production d'estérase est indiquée par l'halo clair ou bien un précipité autour de la culture de champignon.

Chapitre III :

Résultats et discussions

III.1. Dénombrement de la flore totale rhizosphérique

Le dénombrement de la flore totale du sol rhizosphérique de huit cultivar de palmier dattier des deux régions (Tarite et Kenadsa) de la willaya de Béchar (tableau 02).

Tableau 03: Dénombrement de la flore totale (fongique et bactérienne) du sol rhizosphérique.

Code, dilution et la répétition	Nombre de colonies
TBs-2(1)	93
TBs-2(2)	70
TBs-2(3)	39
TBs-4(1)	36
TBs-4(2)	58
TBs-4(3)	31
TFs-2(1)	56
TFs-2(2)	78
TFs-2(3)	47
TFs-4(1)	52
TFs-4(2)	42
TFs-4(3)	39
TCs-2(1)	168
TCs-2(2)	218
TCs-2(3)	163
TCs-4(1)	15
TCs-4(2)	22
TCs-4(3)	32
TRs-2(1)	138
TRs-2(2)	50
TRs-2(3)	97
TRs-4(1)	24
TRs-4(2)	27
TRs-4(3)	56
KHs-2(1)	13
KHs-2(2)	14
KHs-2(3)	15
KHs-4(1)	1
KHs-4(2)	1
KHs-4(3)	2
KTs-2(1)	29
KTs-2(2)	38
KTs-2(3)	27
KTs-4(1)	1
KTs-4(2)	2
KTs-4(3)	6
KFs-2(1)	48
KFs-2(2)	45
KFs-2(3)	6
KFs-4(1)	5

KFs-4(2)	2
KFs-4(3)	3
KMs-2(1)	28
KMs-2(2)	54
KMs-2(3)	34
KMs-4(1)	11
KMs-4(2)	3
KMs-4(3)	3

Les résultats du dénombrement de la flore totale montrent la présence d'une forte densité bactérienne par rapport à la flore fongique,

-La flore microbienne est moins chargée dans la dilution 10^{-4} que 10^{-2}

L'Unité Formant Colonie (UFC) **Tableau 03.**

Biskra : la dilution $10^{-2} : (93+70+39)/3=67,3$

Alors que le dénombrement de UFC/1g de sol de cultivar de Biskra calculé par :

$$67,3 \times 10^{-1} / 10^{-2} = 673$$

Les résultats montrent que la plus forte densité microbienne est constatée chez la variété Cherka de la région de Taghit, alors que la plus faible densité microbienne est remarquée chez la variété Hmira de la région de Kenadsa .

Tableau 0: Dénombrement de la flore totale par variété et par région.

Répétition/ Cultivars	Nombre de colonies		Dénombrement UFC/1g de sol
	Dilution 10^{-2}	Dilution 10^{-4}	
Biskra	67,3	41,66	673
Feggous	60,3	44,33	603
Cherka	183	23	1830
Ras El Hmar	95	35,6	950
Hmira	14	1,33	140
Tinaser	31,3	3	313
Faggous	51	3,33	510
Hmiria	38,6	5,6	386

III.2. Dénombrement de la flore fongique

L'observation à l'œil nu des boîtes montrant une croissance de la flore fongique nous a permis d'éliminer 32 boîtes parmi les 48, soit parce qu'elles comprenaient une forte densité bactérienne ou bien à cause de l'absence d'isolats fongiques.

Les résultats du (**Tableau 04**) montrent un nombre d'isolats fongiques du sol rhizosphérique de deux régions de Taghit et Kenadsa du palmier dattier.

La purification des champions a été effectuée par le repiquage des 46 isolats sélectionnés dans le milieu PDA. L'incubation est réalisée à 27°C pendant 7 jours.

Tableau 05: Nombre d'isolats fongiques

Code	Nombre d'isolats
TBs41	1
TBs42	2
TBs43	3
TFs43	16
TCs43	4
TRs41	2
TRs43	2
KHs41	1
KHs43	1
KTs43	2
KFs21	2
KFs42	4
KFs43	1
KMs23	1
KMs42	1
KMs43	3

III.2. Identification macroscopique et microscopique de la flore fongique rhizosphérique

III.2.1. Identification macroscopique

L'identification macroscopique des 46 champignons a abouti à leur classement en groupes ou en morphotypes (les tableaux 6 jusqu'à 13).

Tableau 06: Identification macroscopique de groupe 01 (face :Noir poudreux
 revers :Verte ondulé)

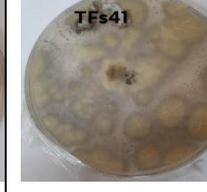
Isolat fongique	Face de boîte	Revers de boîte	Isolat fongique	Face de boîte	Revers de boîte
TRs11			TFs45		
TBs33			TCs32		
KFs31			TBs32		
TFs40			TFs46		
TFs31			TFs41		
TRs32					

Tableau 07: Identification macroscopique de groupe 02 (face :beige duveteux , revers :brun orange lisse)

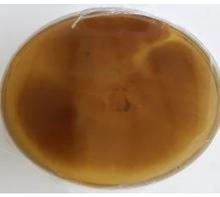
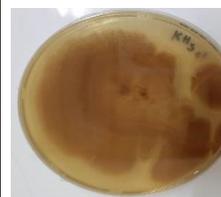
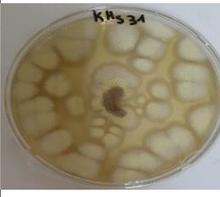
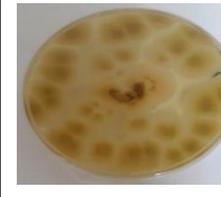
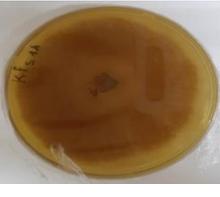
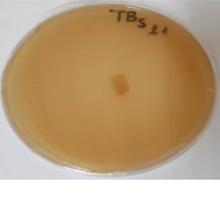
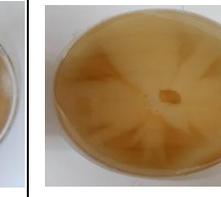
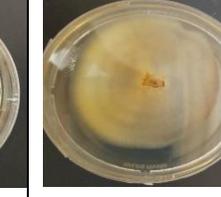
Isolat fongique	Face de boite	Revers de boite	Isolat fongique	Face de boite	Revers de boite
KFs111			KH11		
KTs31			KHs31		
KFs11			KTs32		

Tableau 08 :Identification macroscopique de groupe 03(Face :blanchâtre cotonneux , Revers :jaunâtre lisse)

Isolats fongique	Fase de boite	Revers de boite	Isolat fongique	Face de boite	Revers de boite
TBs21			TFs42		
KMs32			KMs311		

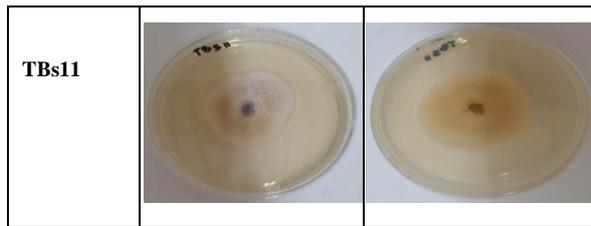


Tableau 09 : Identification macroscopique de groupe 04(Face :verdâtre poudreux ,Revers :jaunâtre lisse)

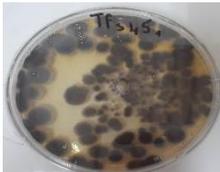
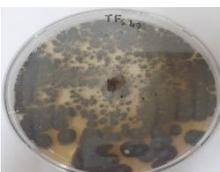
Isolat Fongique	Face de boîte	Revers de boîte	Isolat fongique	Face de boîte	Revers de boîte
TBs31			TFs45 1		
TCs3 3			TCs31		
TFs35			TFs31		
TFs43			TFs44		

Tableau 10 :Identification macroscopique de groupe (Face :Centre verdâtre/ périphérie blanchâtre poudreux ,Revers : jaunâtre lisse)

Isolat fongique	Face de boîte	Revers de boîte	Isolat fongique	Face de boîte	Revers de boîte
KFs2 4			KMs3 1		

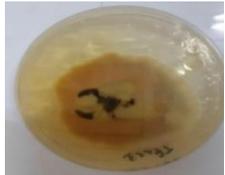
KFs2 2			TFs32		

Tableau 11:identification macroscopique de groupe 06 (Face :Vert floconneuse, Revers :Vert lisse)

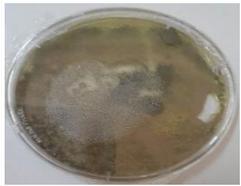
Isolat fongique	Face de boite	Revers de boite	Isolat fongique	Face de boite	Revers de boite
KFs12			KFs23 1		
KFs23 2			TFs3 6		

Tableau 12 : Identification macroscopique de groupe 07 (Face :verdâtre cotoneux , Revers : marron lisse)

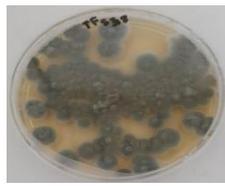
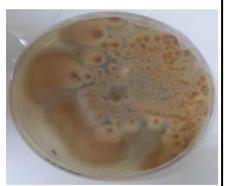
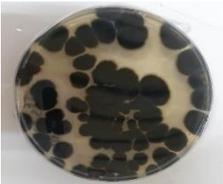
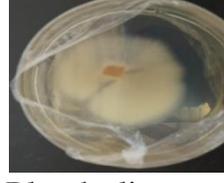
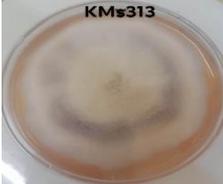
Isolat fongique	Face de boite	Revers de boite	Isolat fongique	Face de boite	Revers de boite
TFs38			TFs37		

Tableau 13 :Identification macroscopique des morphotypes représenté par un seul isolat (Groupe 08 à 14)

Isolat fongique	Face de boite	Revers de boite	Isolat fongique	Face de boite	Revers de boite

<p>Groupe 08 TFs34</p>	 <p>Noir granuleuse</p>	 <p>Noir lisse</p>	<p>Groupe 09 TRs31</p>	 <p>Rose lisse</p>	 <p>Rose lisse</p>
<p>Groupe 10 KMs21</p>	 <p>Noir et blanche floconneuse</p>	 <p>Jaunâtre lisse</p>	<p>Groupe 11 TCs34</p>	 <p>Verte poudreuse</p>	 <p>Jaunâtre lisse</p>
<p>Groupe 12 KFs21</p>	 <p>Noire et blanche floconneuse</p>	 <p>Marron lisse</p>	<p>Groupe 13 TBs22</p>	 <p>Blanchâtre cotonneuse</p>	 <p>Blanche lisse</p>
<p>Groupe 14 KMs313</p>	 <p>Violet à blanche cotonneuse</p>	 <p>Centre blanc épérophérie violacé lisse</p>			

III.2.2. Identification microscopique

Observation microscopique à été fait a l'aide d'un microscope optique au grossissement x40 . Quatorze champignons ont été sélectionnés et représente chaque groupe ou morphotype (Les figures 3 jusqu'à 16).

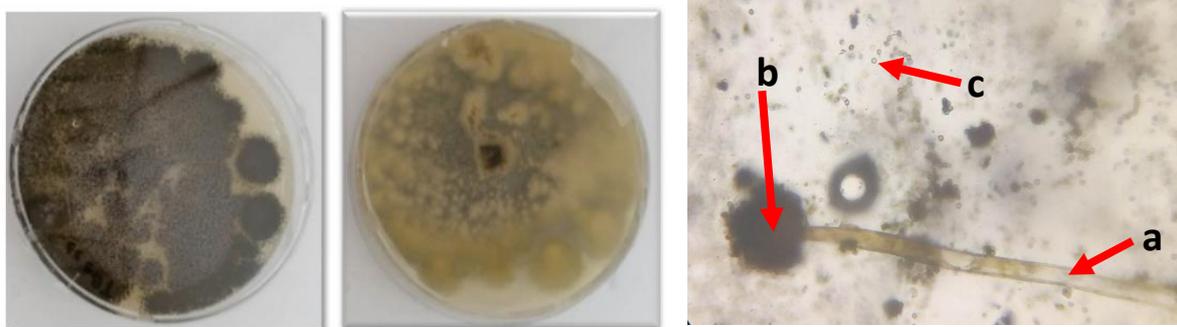


Figure 03: Caractérisation macroscopique et microscopique de **TBs33** (*Aspergillus niger*) (G×40). a : conidiophore , b :tête aspergillaire , c : conidies

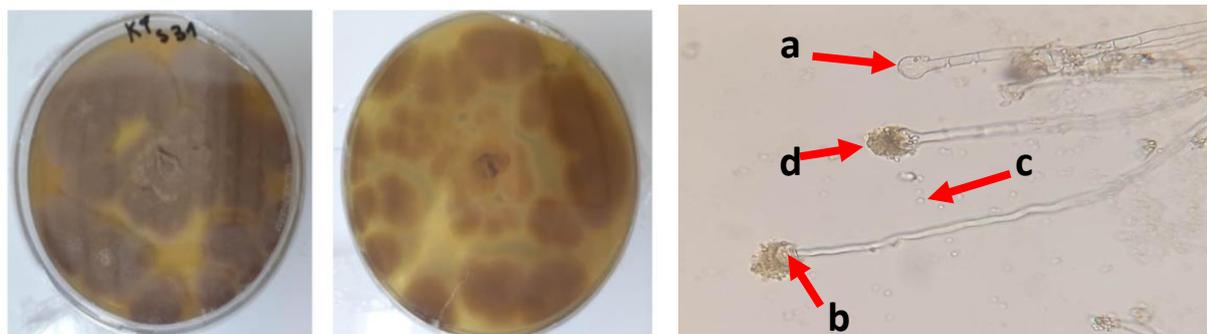


Figure 04: Caractérisation macroscopique et microscopique de **KT31** *Aspergillus terreus*. (G×40). : a :tête jeun , b : vésicule ,c : conidies ,d : tête aspergillaire

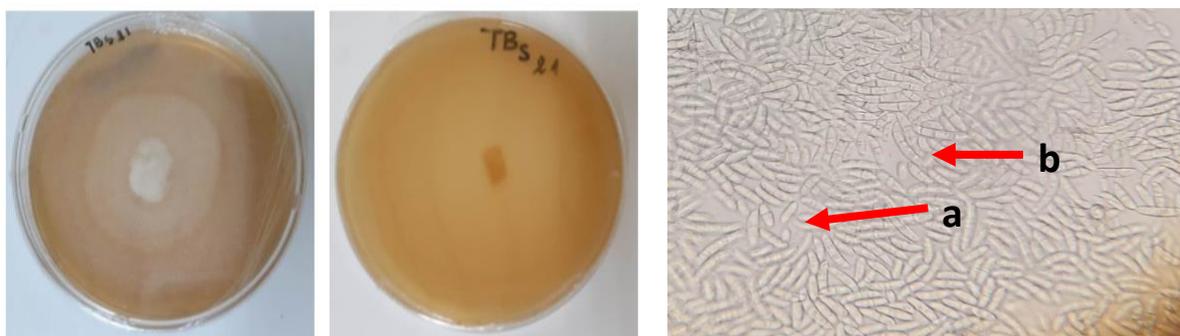


Figure 05 : Caractérisation macroscopique et microscopique de **TBs21** *Fusarium* sp (G×40) : a :microconidie ,b : macroconidies

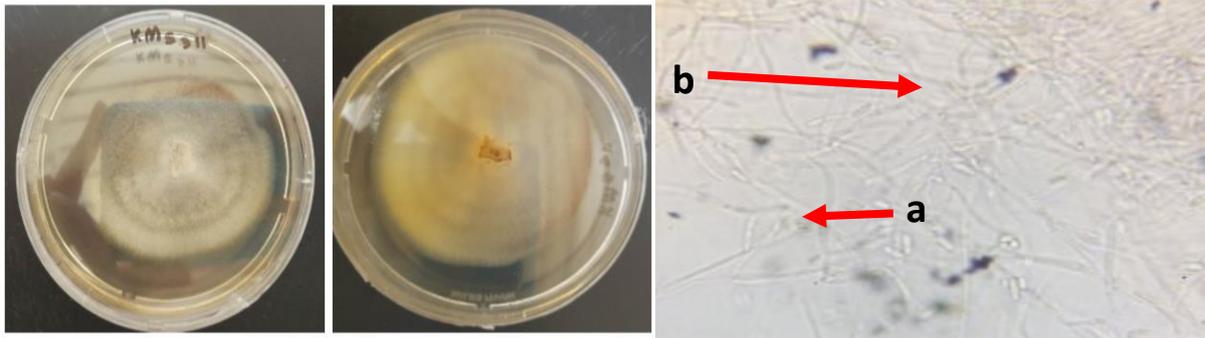


Figure 06 :Caractérisation macroscopique et microscopique de **TBs22** *Verticillium* sp (G×40).a ; b : Conidiophores, c :spore.

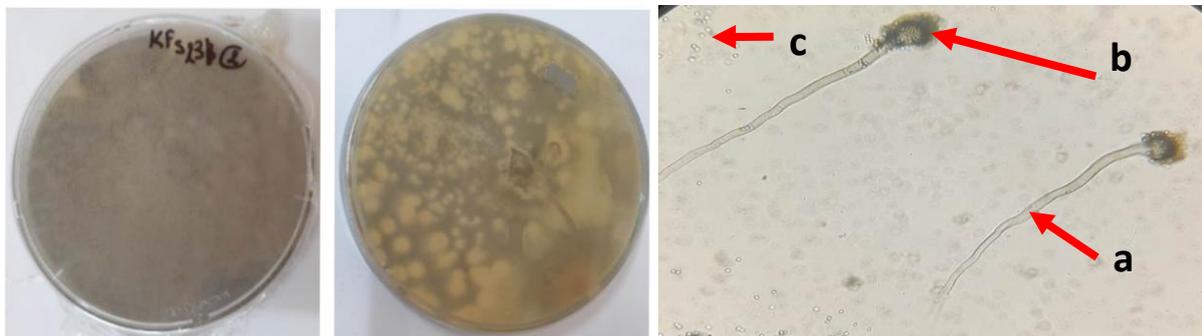


Figure 07 :Caractérisation macroscopique et microscopique de **KFs232** *Aspergillus* sp (G×40) : a : conidiophore, b :Tête aspergillaire , c :amas.

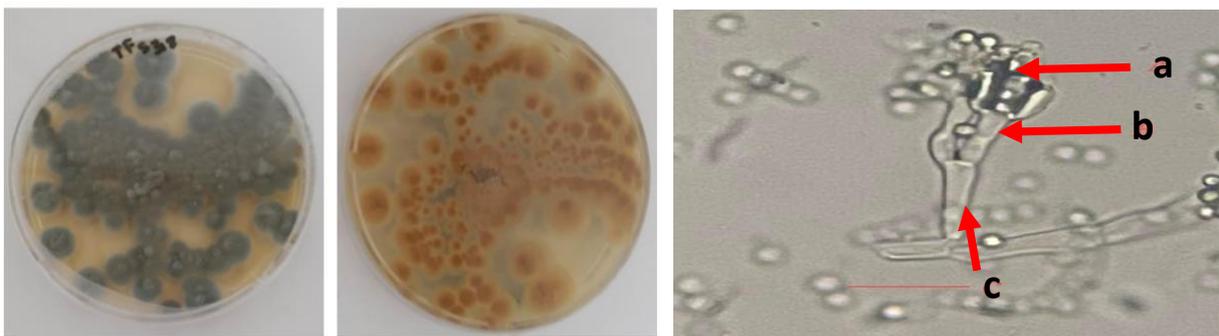


Figure 08 : Caractérisation macroscopique et microscopique de **TFs38** *Penicillium* sp (G×40) . a : conidies, b : phialides, c : pinceau pénicillair

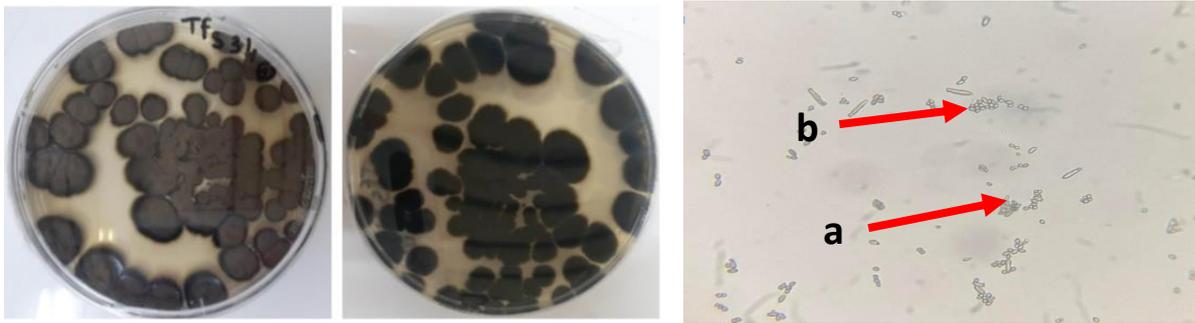


Figure 09: Caractérisation macroscopique et microscopique de **TFs34** *Cladosporium* sp (G×40) :a bourgeonnement , b : conidie



Figure 10: Caractérisation macroscopique et microscopique de **TRs31** *Rhodotorula* sp,(G×40) : a : bourgeonnement , b : spore

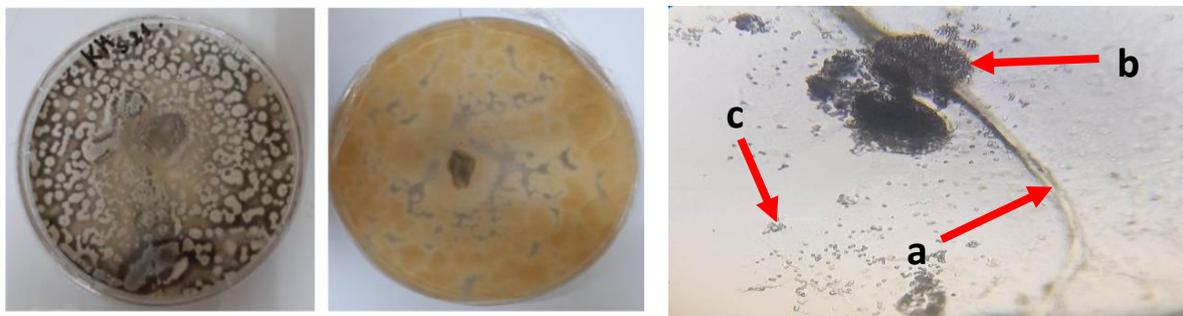


Figure 11: Caractérisation macroscopique et microscopique de **KMs21** *Aspergillus* sp (G×40). a : Conidiophores, b :Tête aspergillaire , c :conidies.

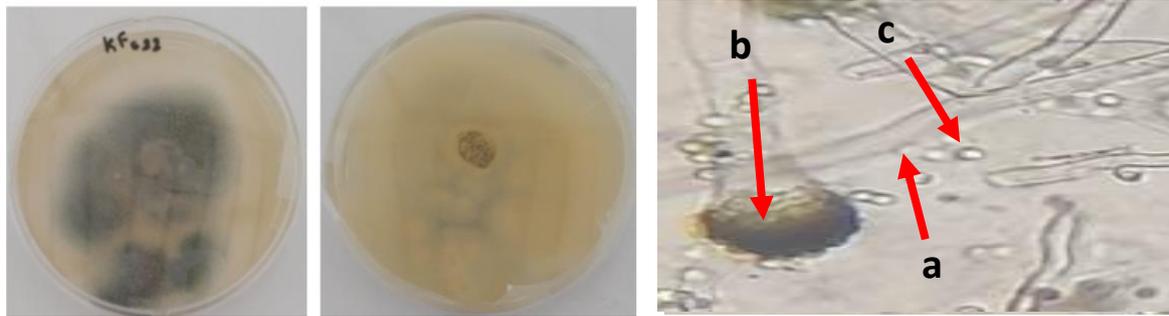


Figure 12 :Caractérisation macroscopique et microscopique de **KFs22** *Aspergillus* sp (G×40) : a :conidiophore , b : Tête aspergillaire ,c : conidie.

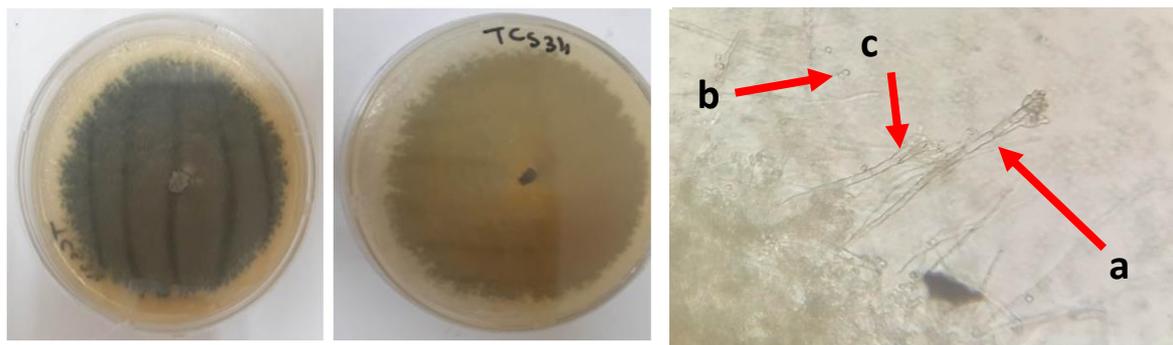


Figure 13:Caractérisation macroscopique et microscopique de **TCs34** *Penicillium* sp (G×40),. a :pinceau pénicillair, b : conidies, c : phialides

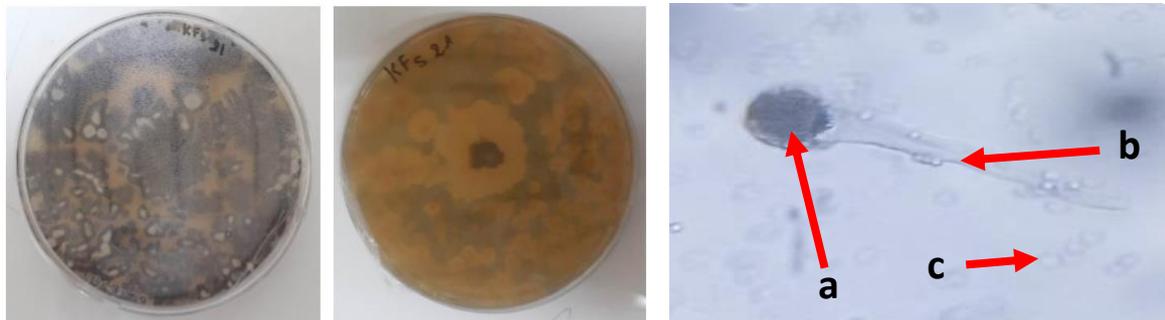


Figure 14:Caractérisation macroscopique et microscopique de **KFs21** *Aspergillus* sp (G×40). a :Tête aspergillaire ,b : conidiophore, c :Conidies

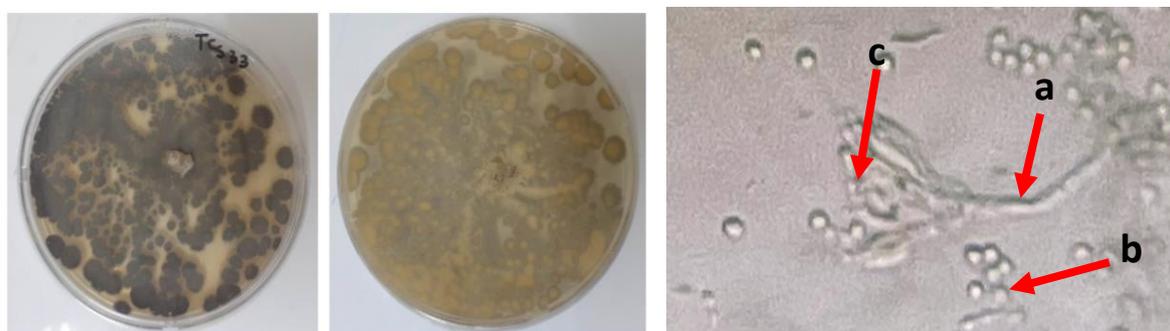


Figure 15 :Caractérisation macroscopique et microscopique de **TCs33** *Penicillium* Sp(G×40): a :pinceau pénicillair,b :conidies, c : phialides

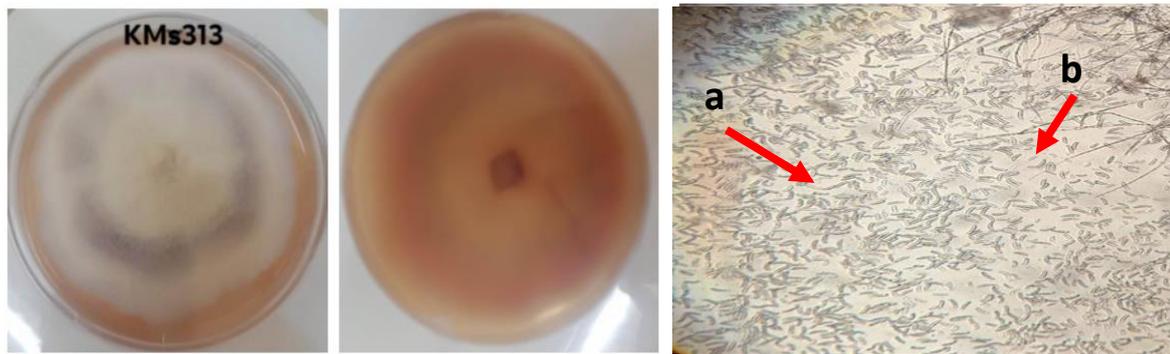


Figure 16 : Caractérisation macroscopique et microscopique de **TBs21** *Fusarium* sp. (G×40),: a :macroconidies : b :microconidies.

Le genre *Aspergillus* est caractérisé par la présence d'une tête aspergillaire, hyphe septé (Varga et al., 2011). *Aspergillus niger* sont des espèces les plus courantes et les plus facilement identifiables de forme globuleuse à subglobuleuse continent des têtes conidiennes noire, radiées et bisériées avec des métules deux fois plus longues que les phialides. *Aspergillus terreus* contient une tête aspergillaire en forme d'éventail, Conidiophore , hyalin assez long, se terminant par une vésicule hémisphérique, Les phialides hyalins, parallèles, produisant des conidies lisses globuleuses.

Le genre *Penicillium* sp. se distinguent par leur organisation en pinceau. Le thalle est formé de filaments mycéliens septés et hyalins, porte des conidiophores lisses ou granuleux, simples ou ramifiés qui se terminent par un pénicille.

Le genre *Cladosporium* est défini par des filaments mycéliens non cloisonnés pigmentés. Conidiogenèse de type blastique acropète, grands conidiophores bruns plus foncés que les filaments mycéliens, on distingue plusieurs types de conidies ; grandes conidies rectangulaires parfois cloisonnées qui se reproduisent par bourgeonnement des petites conidies et les petites conidies ovalaires cicatrices pigmentées aux extrémités des conidies (Sandoval-Denis et al., 2015).

Le genre *Fusarium* est représenté par des hyphes, conidiophores, phialides, macroconidies et microconidies qui sont septés et hyalins. En plus de ces éléments de base, des chlamydospores (Leslie et al., 2006).

Le genre *Rhodotorula* sp. est de forme ovoïde à allongée, pouvant avoir un pseudo ou un vrai mycélium et dont la taille moyenne est de 4 à 10 µm sur 2 à 5µm (Shinde et al., 2008). Il se reproduit par bourgeonnement multilatéral (Höfer et al., 1969; Mares et al., 1982; Schröter and Kopperschläger, 1996).

Le genre *Verticillium* sp. représenté par des phialides solitaires ou verticillés sur des hyphes aériens ou rampants, portant des masses de spores apicalement.rampantes. Conidies phialospores, hyalines, et cylindriques

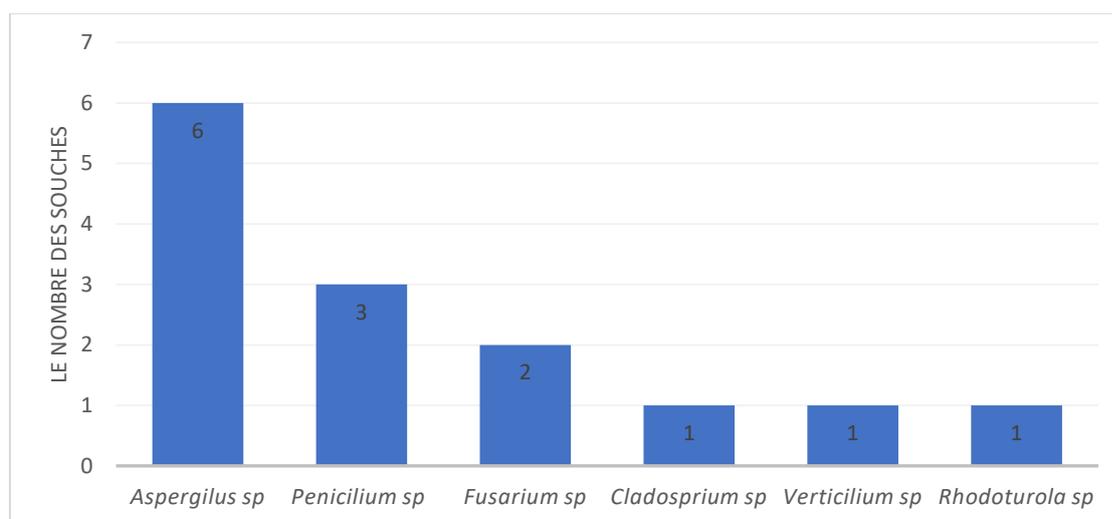


Figure 17 : Figure indiquant le nombre de souche par genre

III.3.Activités enzymatiques

L'activité enzymatique de dix souches fongiques sélectionnées pour chaque groupe à été réalisé par des méthodes qualitatives pour la production des enzymes extracellulaires.

III.3.1.Activité chitinasique

Les résultats montrent que la majorité des souches testées que 90% ont la capacité de produire la chitinase à cause de l'observation d'une bonne croissance des champignons sur le milieu . Comme indiqué dans la Figure 18 :KMs21 *Aspergillus* sp. est la seul souche qui n'a pas produit de la chitinase (Tableau 13).

Tableau 13: Résultats de l'activité chitinasique des souches testées.

Isolats	Réactions
B: KFs11 <i>Aspergillus terreus</i>	+
C : KMs21 <i>Aspergillus</i> sp.	-
D : TFs34 <i>Cladosporium</i> sp.	+

E : TFs37 <i>Penicillium</i> sp.	+
F :KFs24 <i>Aspergillus</i> sp	+
G : TBs33 <i>Aspergillus niger</i>	+
H : TBs21 <i>Fusarium</i> sp.	+
I :TCs34 <i>Penicillium</i> sp.	+
J : TRs31 <i>Rhodotorula</i> sp.	+
K : TCs33 <i>Penicillium</i> sp.	+

(+) : Activité positive ; (-) : Activité négative

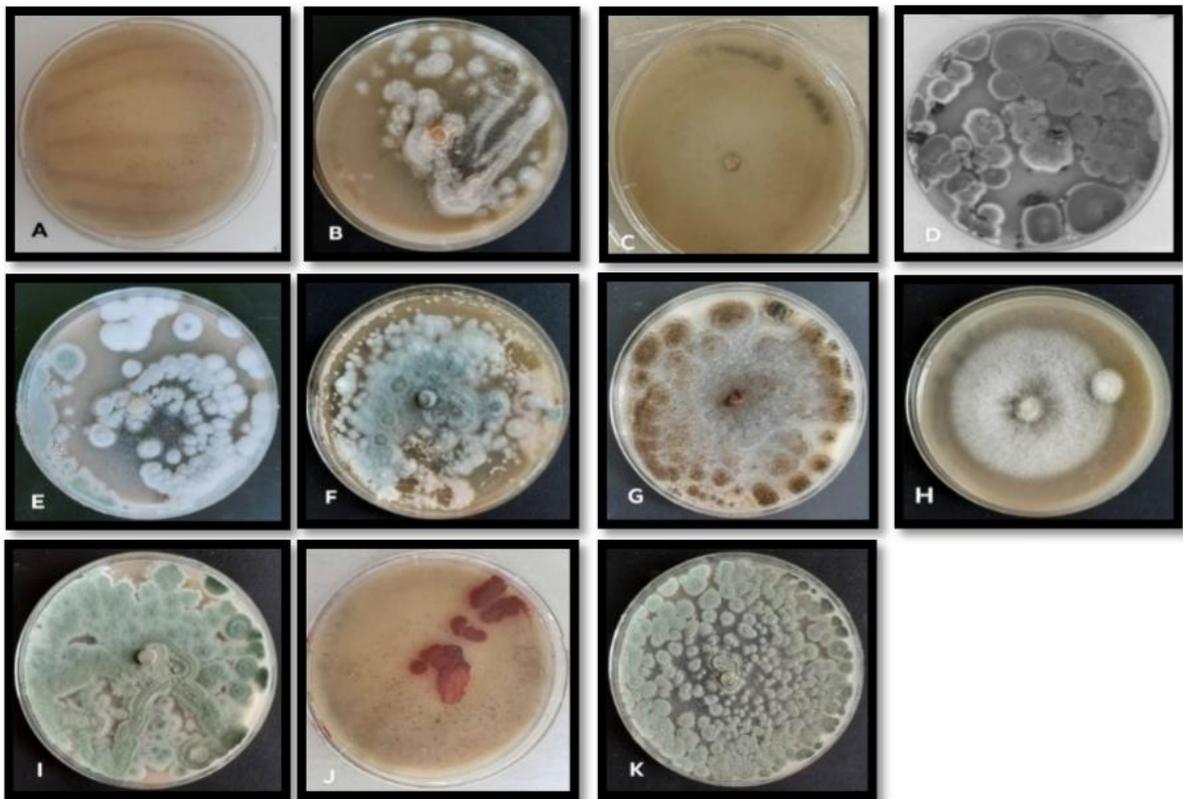


Figure 18 : Activité Chitinasique des souches fongiques testées , **A** :Témoïn.,**B**: KFs11 :*Aspergillus terreus*., **C** :KMs21 :*Aspergillus* sp., **D** :TFs34 *Cladosporium* sp., **E** :TFs37 *Penicillium* sp, **F** :KFs24 *Aspergillus* sp., **G** :TBs33 *Aspergillus niger*., **H** :TBs21 *Fusarium* sp., **I** : TCs34 *Penicillium* sp ., **J** : TRs31 *Rhodotorula* sp., **K** : TCs33 *Penicillium* sp.

La chitine est un composé des parois cellulaires des champignons filamenteux. Les chitinases sont donc produites à différents stades de leur croissance. Elles sont impliquées dans la séparation et la germination des spores. Chez les levures, les chitinases sont impliquées dans le bourgeonnement des cellules filles et leur séparation avec les cellules mères. Les hyphes mycéliens possédant une structure rigide, les chitinases permettent de remodeler la chitine des

parois fongiques lors de la croissance et du développement, mais aussi lors de stress hydriques (Gooday et al., 1992). Les champignons pathogènes utilisent leurs chitinases pour faciliter leur pénétration dans l'hôte ou pour exploiter les sucres et acides aminés issus de la dégradation des cuticules. Le rôle des chitinases varie en fonction des organismes qui les produisent. Elles peuvent participer aux processus de nutrition, de croissance ou bien de défense. Plusieurs souches fongiques sont productrices de chitinase parmi elles, nous trouvons les souches du genre *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Fusarium* sp., *Cladosporium* sp., et *Rhodotorula* sp.

III.3.2. Activité amylolytique

Les résultats de l'activité amylolytique montrent que toutes les souches testées ont réagi positivement et cela par l'apparition d'un halo clair autour des colonies après inoculation des boîtes avec le réactif lugol qui indique dans le (Tableau 14), et la (Figure 19).

Tableau 15: Résultats de l'activité amylolytique des souches testées.

Isolats	Réactions
B: KFs11 <i>Aspergillus terreus</i>	+
C : KMs21 <i>Aspergillus</i> sp.	+
D : TFs34 <i>Cladosporium</i> sp.	+
E : TFs37 <i>Penicillium</i> sp.	+
F : KFs24 <i>Aspergillus</i> sp.	+
G : TBs33 <i>Aspergillus niger</i>	+
H : TBs21 <i>Fusarium</i> sp.	+
I : TCs34 <i>Penicillium</i> sp.	+
J : TRs31 <i>Rhodotorula</i> sp.	+
K : TCs33 <i>Penicillium</i> sp.	+

(+) : Activité positive ; (-) : Activité négative

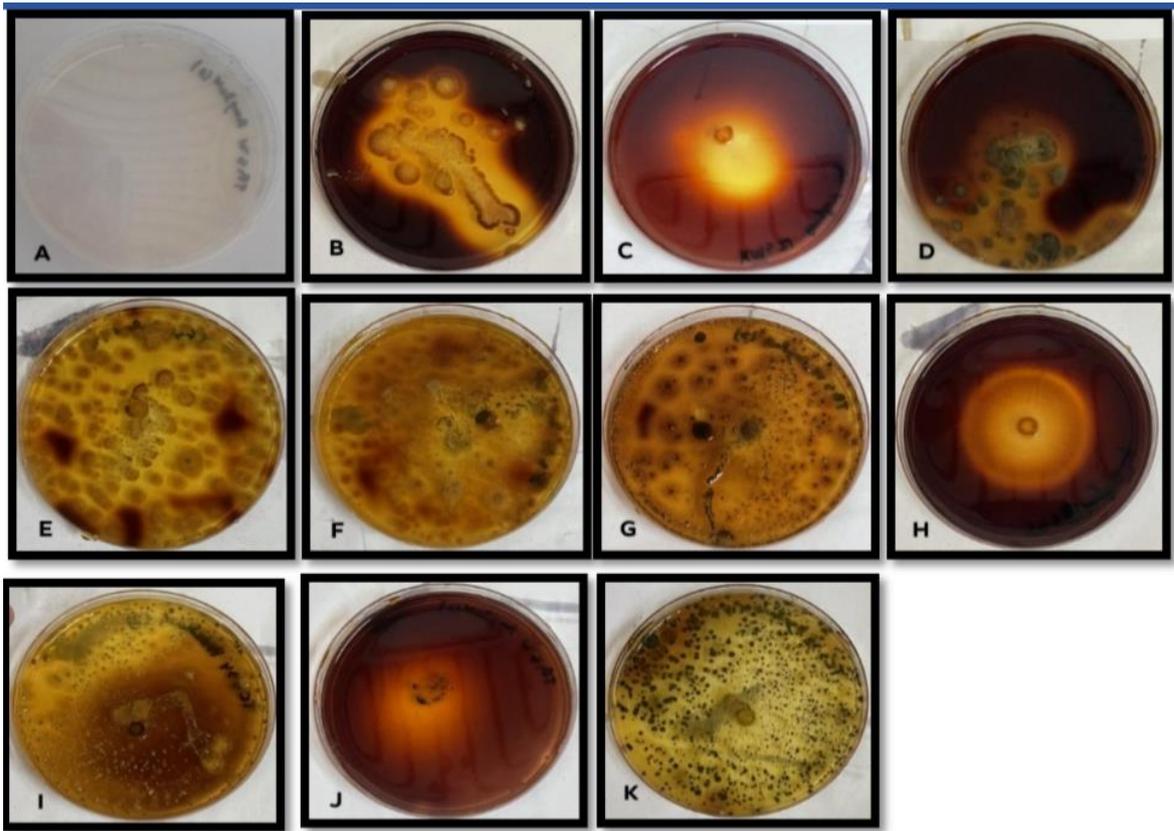


Figure 19 : Activité Amylolytique des souches fongiques testées. **A** :Témoin., **B**: KFs11 :*Aspergillus terreus*., **C** :KMs21 :*Aspergillus* sp ; **D** :TFs34 *Cladosporium* sp., **E** :TFs37 *Penicillium* sp, **F** :KFs24 *Aspergillus* sp., **G** :TBs33 *Aspergillus niger*., **H** :TBs21 *Fusarium* sp., **I** : TCs34 *Penicillium* sp ., **J** : TRs31 *Rhodotorula* sp., **K** : TCs33 *Penicillium* sp.

Les producteurs principaux de l'amylase d'origine fongique sont les moisissures des genres *Aspergillus* et *Rhizopus* et *Fusarium*. En plus des moisissures, les levures comme *Sacchromyces cerevisiae* et *Rhodotorula* participent également à la production de l'amylase (Bouix et Leveau, 1999).les résultats que nous avons obtenus ce sont similaires à ces derniers car toutes les souches montrent des réactions positives pour le test amylase.

III.3.3.Activité pectique

Les résultats obtenus indique que la majorité des souches testés ont synthétisé l'enzyme pectinase qui se traduit par une bonne croissance des colonie dans le milieu testé. Une exception est constatée pour les souches KMs21 *Aspergillus* sp. , et TRs31 *Rhodotorula* sp. (Tableau 15), (Figure 20).

Tableau 16 : Résultats de l'activité pectique des souches testées.

Isolats	Réactions
B : KFs11 <i>Aspergillus terreus</i>	+
C : KMs21 <i>Aspergillus</i> sp.	-
D : TFs34 <i>Cladosporium</i> sp.	+
E : TFs37 <i>Penicillium</i> sp.	+
F :KFs24 <i>Aspergillus</i> sp.	+
G : TBS33 <i>Aspergillus niger</i>	+
H : TBS21 <i>Fusarium</i> sp.	+
I :TCs34 <i>Penicillium</i> sp.	+
J : TRs31 <i>Rhodotorula</i> sp.	-
K : TCs33 <i>Penicillium</i> sp.	+

(+) : Activité positive ; (-) : Activité négative

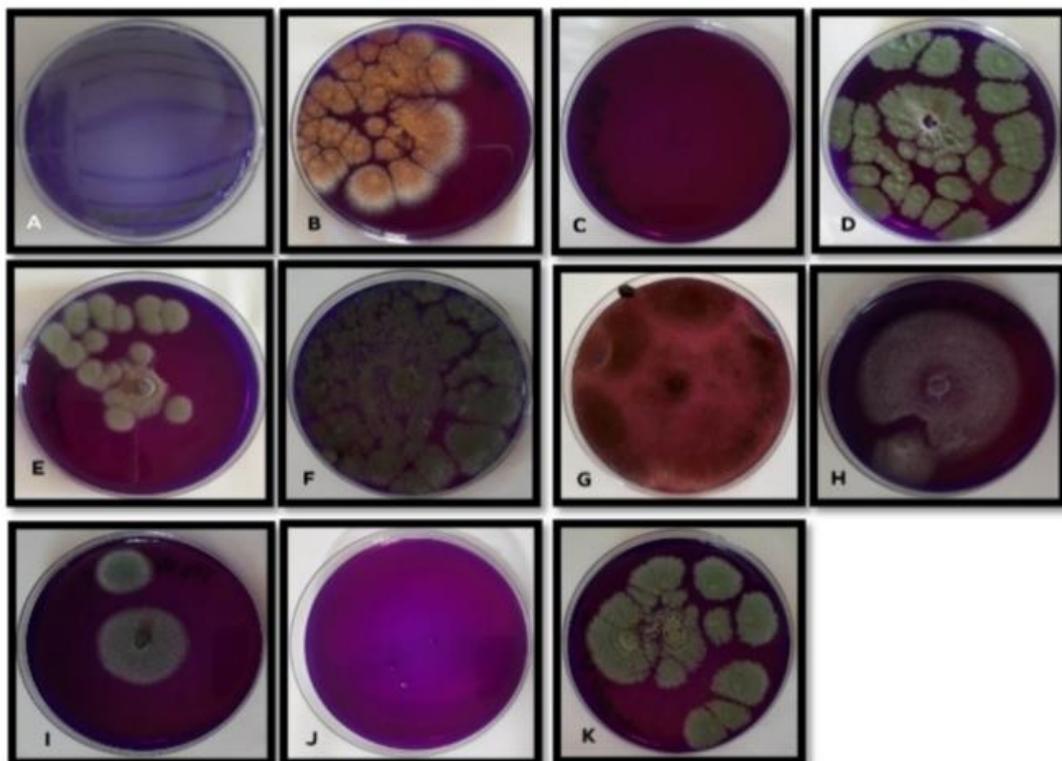


Figure 20 : Activité pectique des souches fongiques testées . **A** :Témoin., **B**: KFs11 :*Aspergillus terreus* ., **C** :KMs21 :*Aspergillus* sp ; **D** :TFs34 *Cladosporium* sp., **E** :TFs37 *Penicillium* sp, **F** :KFs24 *Aspergillus* sp., **G** :TBS33 *Aspergillus niger*., **H** :TBS21 *Fusarium* sp., **I** : TCs34 *Penicillium* sp ., **J** : TRs31 *Rhodotorula* sp., **K** : TCs33 *Penicillium* sp.

La pectinase est également une protéine sécrétée par divers champignons et pouvant être dénaturée par l'action néfaste d'une trop faible température ou d'acidités ou alcalinités élevées. Les champignons isolés du sol produisent des pectinases telles que : *Aspergillus niger* (Sidra et al., 2013), *Aspergillus terreus* (Pedrolli et al., 2008), *Penicillium* sp. (Yadav et al., 2009), *Fusarium* sp (Mutsui, Y., 1991), *Cladosporium* sp (Bosatos et al., 2013).

III.3.4. Activité lipasique

Les résultats de l'activité lipasique montrent que 90 % des souches fongiques ont peu synthétisé l'enzyme lipase et cela par la présence d'un halo clair ou une précipitation autour des colonies (Figure 21), Une exception est constatée chez la souche KMs21 *Aspergillus* sp. (Tableau 16).

Tableau 17 : Résultats de l'activité lipasique des souches testées.

Isolats	Réactions
B : KFs11 <i>Aspergillus terreus</i>	+
C : KMs21 <i>Aspergillus</i> sp.	-
D : TFs34 <i>Cladosporium</i> sp.	+
E : TFs37 <i>Penicillium</i> sp.	+
F : KFs24 <i>Aspergillus</i> sp.	+
G : TBS33 <i>Aspergillus niger</i>	+
H : TBS21 <i>Fusarium</i> sp.	+
I : TCs34 <i>Penicillium</i> sp.	+
J : TRs31 <i>Rhodotorula</i> sp.	+
K : TCs33 <i>Penicillium</i> sp.	+

(+) : Activité positive ; (-) : Activité négative

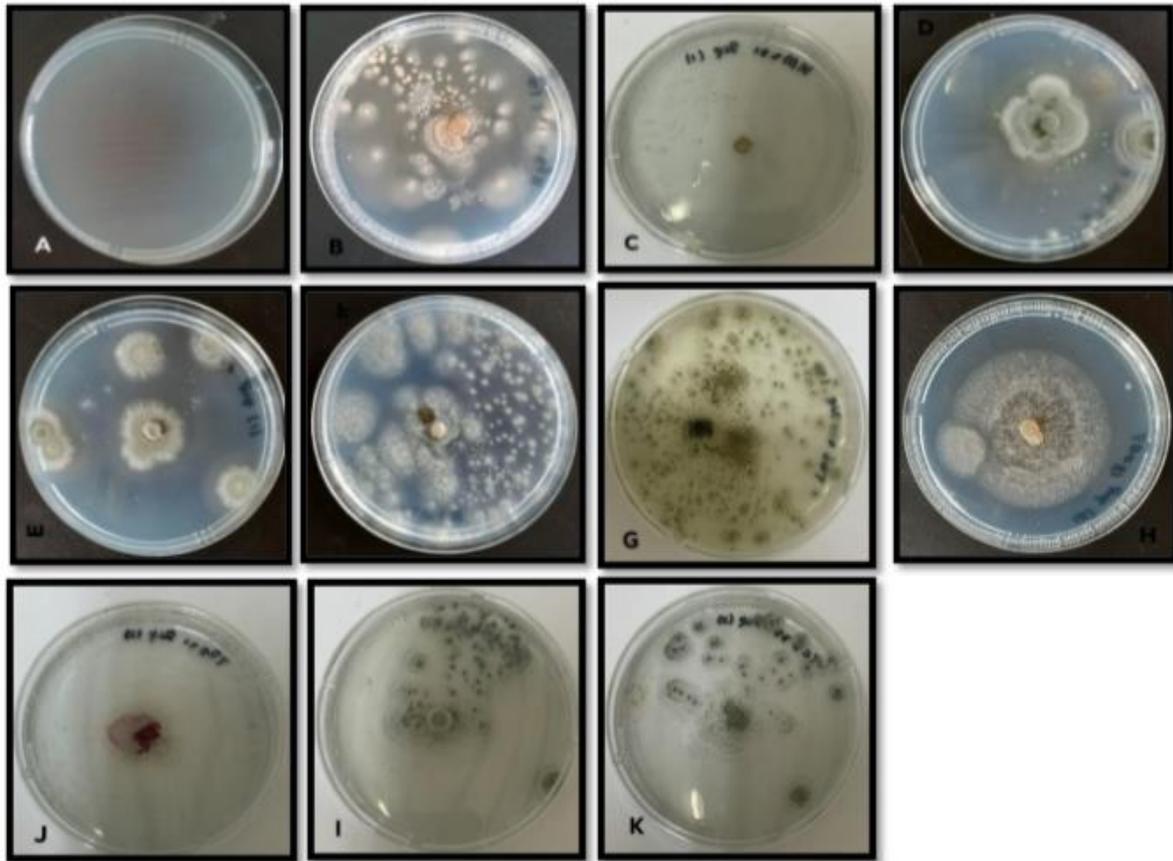


Figure 21: Activité lipasique des souches fongiques testées. **A** :Témoin., **B**: KFs11 :*Aspergillus terreus*., **C** :KMs21 :*Aspergillus* sp ; **D** :TFs34 *Cladosporium* sp., **E** :TFs37 *Penicillium* sp, **F** :KFs24 *Aspergillus* sp., **G** :TBs33 *Aspergillus niger*., **H** :TBs21 *Fusarium* sp., **I** : TCs34 *Penicillium* sp ., **J** : TRs31 *Rhodotorula* sp., **K** : TCs33 *Penicillium* sp

D'après Sharma *et al.* (2016), les champignons filamenteux sont des sources préférées de lipases parmi le reste des microorganismes producteurs de lipase. Ces souches *Aspergillus niger*, *Rhizopus* et *Penicillium*, *Geotrichum candidum* sont des catalyseurs attractifs pour la modification des lipides. Selon Toscano *et al.*, (2011), qui ont réalisé des travaux sur l'activité lipasique des souches d'*Aspergillus niger* ont démentent une plus forte activité lipasique et cela rentre une similarité avec les résultats que nous avons obtenu de la souche TBs33 d'*A. niger*. et *A. terreus*.

III.3.5. Activité estérasique

Les résultats de l'activité estérasique indiquent que toutes les souches testées (Tableau 17), à l'exception de la souche KMs21 *Aspergillus* sp ont peut synthétiser l'enzyme estérase par la présence d'un halo claire ou une précipitation autour des colonies (Figure 22).

Tableau 18: Résultats de l'activité estérasique des souches testées.

Isolats	Réactions
B: KFs11 <i>Aspergillus terreus</i>	+
C : KMs21 <i>Aspergillus</i> sp.	-
D : TFs34 <i>Cladosporium</i> sp.	+
E : TFs37 <i>Penicillium</i> sp.	+
F : KFs24 <i>Aspergillus</i> sp.	+
G : TBs33 <i>Aspergillus niger</i>	+
H : TBs21 <i>Fusarium</i> sp.	+
I : TCs34 <i>Penicillium</i> sp.	+
J : TRs31 <i>Rhodotorula</i> sp.	+
K : TCs33 <i>Penicillium</i> sp.	+

(+) : Activité positive ; (-) : Activité négative

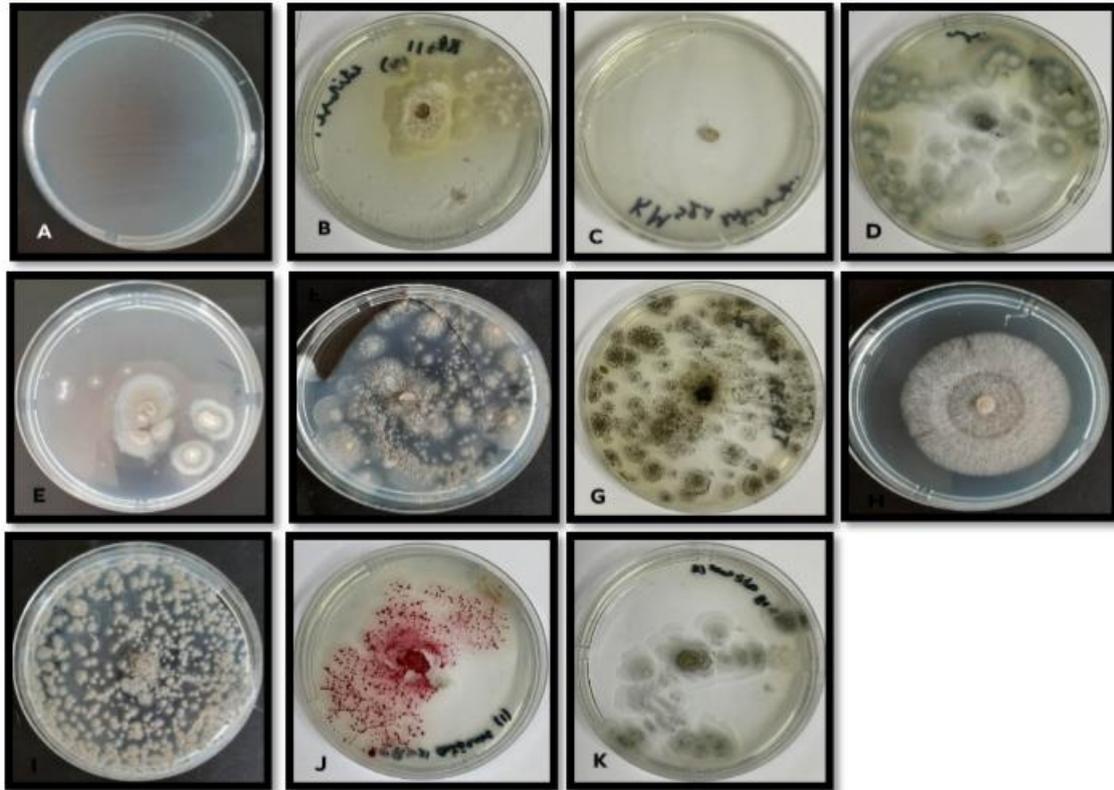


Figure 22 : Activité estérasique des souches fongiques testées. **A** :Témoïn., **B**: KFs11 :*Aspergillus terreus*., **C** :KMs21 :*Aspergillus* sp ; **D** :TFs34 *Cladosporium* sp., **E** :TFs37 *Penicillium* sp, **F** :KFs24 *Aspergillus* sp., **G** :TBS33 *Aspergillus niger*., **H** :TBS21 *Fusarium* sp., **I** : TCs34 *Penicillium* sp ., **J** : TRs31 *Rhodotorula* sp., **K** : TCs33 *Penicillium* sp

Les estérases sont produites par un ensemble d'organismes, tels que les champignons du sol *Fusarium* sp., *Penicillium* sp, *Aspergillus* sp., *Sporotrichum* sp. , *Rhodotorula*, *Candida* sp., des plantes et des animaux (Ramnath et al., 2001). Cela corrobore avec les résultats que nous avons obtenues et que la plupart des souches testées ont répondu positivement au test d'estérase.

III.3.6Activité protéolytique

Les résultats de l'activité protéolytique indiquent que 60% des souches testées ont réagi positivement par la présence d'un halo claire autour des colonies ou une décoloration du milieu. Alors que les souches d' *Aspergillus* sp., *Fusarium* sp., et *Rhodotorula* sp. et *penicillium* sp ont réagi négativement vis-à-vis ce test (Tableau 18) ,(Figure 23).

Tableau 19: Résultats de l'activité protéolytique des souches testées.

Isolats	Réactions
B :KFs11 <i>Aspergillus terreus</i>	+
C :KMs21 <i>Aspergillus</i> sp.	-
D :TFs34 <i>Cladosporium</i> sp.	+
E :TFs37 <i>Penicillium</i> sp.	+
F :KFs24 <i>Aspergillus</i> sp.	-
G :TBs33 <i>Aspergillus niger</i>	+
H :TBs21 <i>Fusarium</i> sp.	-
I :TCs34 <i>Penicillium</i> sp.	+
J :TRs31 <i>Rhodotorula</i> sp.	-
K :TCs33 <i>Penicillium</i> sp.	+

(+) : Activité positive ; (-) : Activité négative

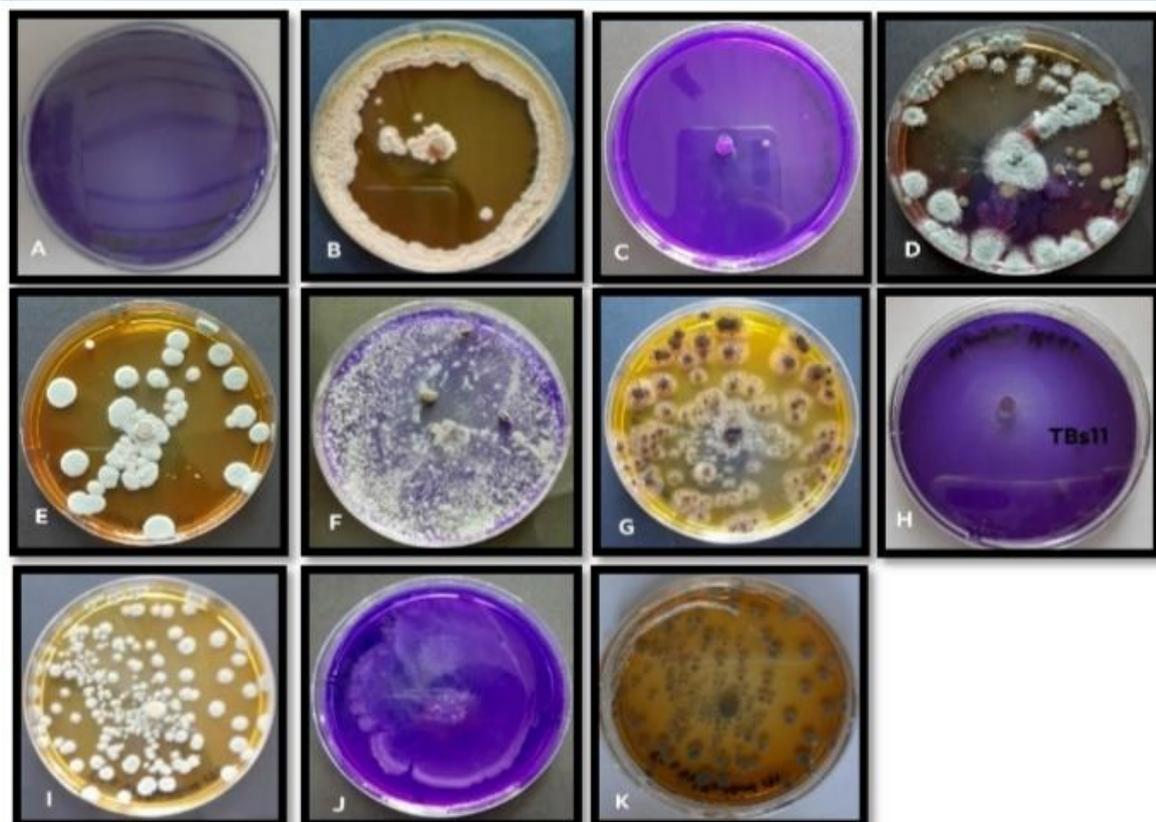


Figure 23 : Activité protéolytique des souches fongiques testées. **A** :Témoïn., **B**: KFs11 :*Aspergillus terreus*., **C** :KMs21 :*Aspergillus* sp ; **D** :TFs34 *Cladosporium* sp., **E** :TFs37 *Penicillium* sp, **F** :KFs24 *Aspergillus* sp., **G** :TBs33 *Aspergillus niger*., **H** :TBs21 *Fusarium* sp., **I** : TCs34 *Penicillium* sp ., **J** : TRs31 *Rhodotorula* sp., **K** : TCs33 *Penicillium* sp

Les protéases peuvent être produites par les moisissures, les levures et les bactéries. Pour les moisissures, les protéases constituent les enzymes les plus importantes qui peuvent être produites par plusieurs genres fongiques tels que *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Geotrichum*, *Fusarium*, *Rhizomucor*, *Endothia*, etc. (Frazier, 1967; haq et al., 2003). Certaines levures produisent aussi des enzymes protéolytiques, il s'agit essentiellement des genres *Saccharomyces*, *Rhodotorula*, *Candida*, *Debaryomyces* (Kresze, 1991; Boiron, 1996). Les résultats que nous avons obtenus ne sont pas similaires à 100% à ces derniers car *Aspergillus* sp. et *Fusarium* sp. ont montré des réactions négatives vis-à-vis de test de protéase.

III.3.7. Activité phosphatasique

Les résultats de l'activité phosphatasique indiquent que 90% des souches testées ont montré une réponse positive par la présence d'un halo clair aux bords des colonies ou une décoloration du milieu (Tableau 19), (Figure 24).

Tableau 20: Résultats de l'activité phosphatasique des souches testées.

Isolats	Réactions
B: KFs11 <i>Aspergillus terreus</i>	+
C : KMs21 <i>Aspergillus</i> sp	-
D : TFs34 <i>Cladosporium</i> sp.	+
E : TFs37 <i>Penicillium</i> sp.	+
F : KFs24 <i>Aspergillus</i> sp.	+
G : TBs33 <i>Aspergillus niger</i>	+
H : TBs21 <i>Fusarium</i> sp.	+
I : TCs34 <i>Penicillium</i> sp.	+
J : TRs31 <i>Rhodotorula</i> sp.	+
K : TCs33 <i>Penicillium</i> sp	+

(+) : Activité positive ; (-) : Activité négative

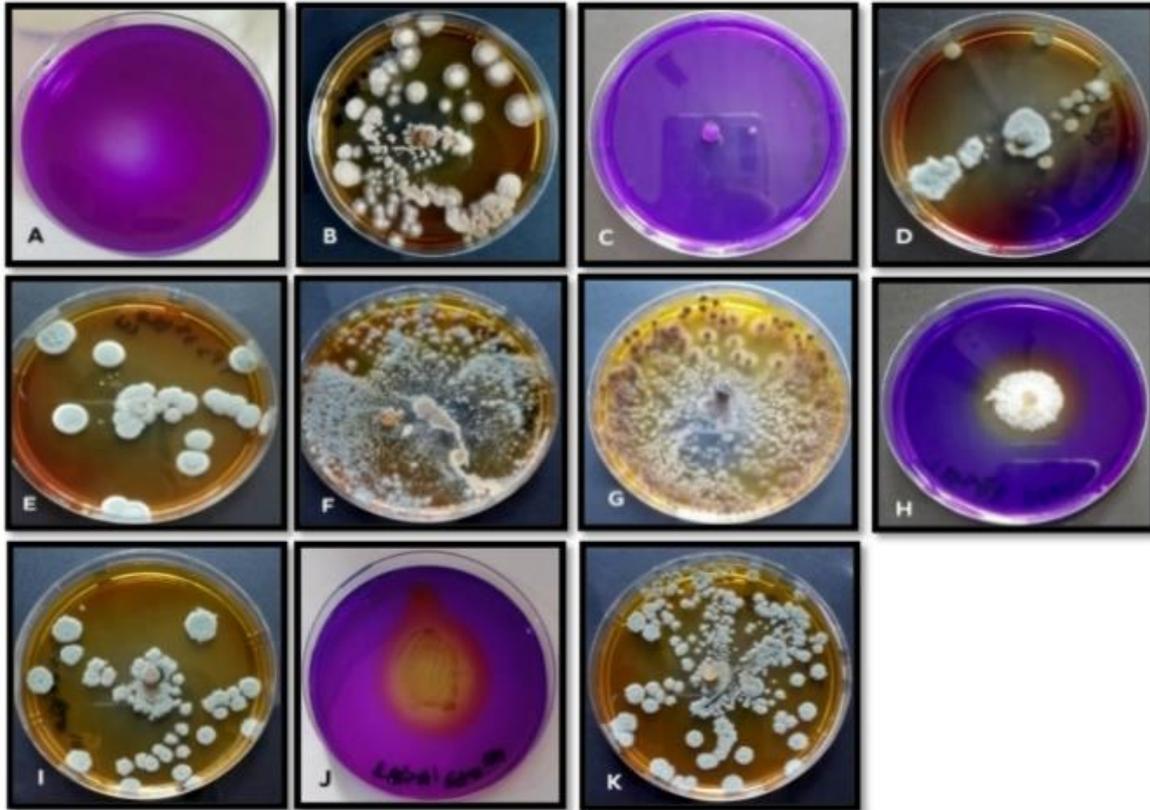


Figure 24 : Activité phosphatasique des souches fongiques sélectionnés. **A** :Témoin., **B**: KFs11 :*Aspergillus terreus*., **C** :KMs21 :*Aspergillus* sp ; **D** :TFs34 *Cladosporium* sp., **E** :TFs37 *Penicillium* sp, **F** :KFs24 *Aspergillus* sp., **G** :TBs33 *Aspergillus niger*., **H** :TBs21 *Fusarium* sp., **I** : TCs34 *Penicillium* sp ., **J** : TRs31 *Rhodotorula* sp., **K** : TCs33 *Penicillium* sp

Selon Mohamed Mahmoud (2017), le phosphore (P) est considéré comme un macro nutriment essentiel, et en fonction de sa disponibilité il pourrait limiter la croissance des plantes en raison de ses propriétés structurelles, fonctionnelles et métaboliques. Il se trouve dans les sols sous forme organique et inorganique. D'après Tarafdar et Marschner (1994), beaucoup de champignons du sol produisent des phosphatases. Une forte corrélation avec nos résultats qui montrent que toutes les souches du genre *Penicillium* sp. et la levure *Rhodotorula* sp., *Cladosporium* sp. et *Fusarium* sp. ont présenté une activité positive. La majorité des souches du genre *Aspergillus* sp. ont la capacité de solubilisation de phosphore, plus spécialement *Aspergillus niger* TBs33 ont révélé leur grande capacité à solubiliser le phosphore en milieu PVK, par la décoloration complète du milieu.

Comparaison de l'aptitude enzymatique des genres fongiques testées

Les résultats montrent que toutes les souches de genre *Penicillium* ont une bonne capacité métabolique à synthétiser des enzymes, suivi par la souche TFs34 de genre *Cladosporium*, ensuite la souche TBs21 de genre *Fusarium* et *Rhodotrula* . Les souches de genre *Aspergillus* ont le plus faible aptitude enzymatique par rapport aux autres genres.

Figure 25 : Aptitude enzymatique des souches des genres testés.

Conclusion

Conclusion

De nombreuses études ont démontré le rôle et l'efficacité des champignons du sol rhizosphériques dans la stabilité, le bon fonctionnement de l'écosystème et la décomposition des matières organiques et leur stabilité, qui sont des partenaires puissants en biotechnologiques.

Les enzymes d'intérêts biotechnologique comme l'amylase, la protéase, l'estirase, la pectinas, la lipase et la phosphatase, sont des protéines ayant une activité biocatalytique, ce qui peut accélérer le rythme de nombreuses réactions très spécifiques envers leur substrat et ce sont essentiels dans le processus de la vie, elles sont connues par leur importance dans le maintien de la santé du sol. L'activité enzymatique dans le sol est principalement d'origine microbienne qui jouent un rôle clé dans le processus global de la décomposition de la matière organique dans les écosystèmes.

Les résultats de l'isolement des champignons du sol rhizosphérique du palmier dattier de huit variétés des deux régions de Taghit et Kenadsa de la wilaya de Béchar montrent une diversité fongique très importante. Leurs caractérisations macroscopiques montrent le dénombrement de 46 isolats regroupés en 14 groupes ou différents. Après l'identification microscopique, les isolats sont affiliés à 6 genres différents : *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Verticillium*, *Cladosporium*, *Rhodotorula*. Le genre *Aspergillus* est le plus dominant par rapport aux autres genres et d'après la bibliographie, il exerce un rôle très important en biotechnologie. .

L'activité enzymatique des dix souches fongiques rhizosphériques sélectionnées ont la capacité de produire les enzymes extracellulaires (Chitinase, phosphatase, amylase, lipase, estérase, pectinase, protéase.).

Concernant l'activité amylolytique, toutes les souches testées ont produits l'enzyme amylase. Les souches de *Penicillium* sp (TFs3, TCs33, TCs34) et TBs33 d'*Aspergillus niger* et de KFs11 d'*Aspergillus terreus* et TFs34 de *Cladosporium* sp. ont synthétisé toutes les d'enzymes par contre, la souche KMs21 d'*Aspergillus* sp. a produit l'enzyme amylase seulement, alors que, la souche TBs21 de genre *Fusarium* a synthétisé tous ces enzymes à l'exception de l'enzyme phosphatase. Enfin, on peut conclure que le sol rhizosphérique du palmier dattier de la wilaya de Béchar de deux régions est très héberge une flore fongique qui synthétisent des enzymes extracellulaires d'intérêt biotechnologiques .

Pour une meilleure exploitation des résultats obtenue. Nous proposons les perspectives suivantes :

- Etude quantitative des enzymes.
- Identification moléculaire des champignons isolés pour confirmer leur affiliation à différents genres
- Extraction des enzymes pour leur utilisation dans plusieurs domaines surtout industriels

Références bibliographiques

- Bastos, S. C. et al. Pectinases from a new strain of *Cladosporium cladosporioides* (Fres.) De Vries isolated from coffee bean. *World J. Agric. Sci.* 9, 167–172 (2013).
- Beisson F, Tiss A, Riviere C, Verger R.2000. Methods for lipase detection and assay: a critical review. *Eur J Lipid Sci Technol.* 2:133–153.
- Bharathi D, Rajalakshmi G.2019. Microbial lipases: an overview of screening, production and purification. *Biocatal Agric Biotechnol.* V : 22(101368).
- Bornscheuer UT, Kazlauskas RJ.2006 .Hydrolases in organic synthesis regio- and stereoselective biotransformations. Wiley-VCH; Weinheim.
- Carrim A J I, Barbosa E C & Vieira J D G (2006), Enzymatic activity of endophytic bacterial isolates of *Jacaranda decurrens* Cham (Carobinha-do-campo), *Brazilian Archives of Biology and Technology*, Vol 49, pp353-359
- Cattelan A J, Hartel P G & Fuhrmann J J (1999), Screening for plant growth promoting rhizo bacteria top remote early soyabean growth. *Soil Science Society of American journal*, n° 63(6), pp1670-1680
- Dommergues Y. et Mangenot F., 1970. *Ecologie microbienne du sol [Microbial ecology of soil]*. Masson and Cie editors, Paris, 796 p
- Doni F., Isahak A., Che Mohd Zain C.R., Wan Yusoff W.M, 2014. Physiological and growth response of rice plants (*Oryza sativa* L.) to *Trichoderma* spp. inoculants. *Amb Express.*4(45)
- Dufresne P., 2021. *Identification des Champignons d'importance médicale*. Institut national de santé publique .Ouébec.Canada .58.
- Edwards, J.; Johnson, C.; Santos-Medellín, C.; Lurie, E.; Podishetty, N.K.; Bhatnagar, S.; Eisen, J.A.;Sundaresan, V.(2015) . Structure, variation, and assembly of the root-associated microbiomes of rice. *112* : 911–920.
- Elieh,A.,D, Hamblin, M R , *Chitin & Chitosan* (2016), *Production and Application of Versatile Biomedical Nanomaterials*. *Int. J. Adv. Res*, Vol 4 (3), p411
- Ergan F, Trani M, Andre G,1990. Production of glycerides from glycerol and fatty acid by immobilized lipases in non-aqueous media. *Biotechnol Bioeng.* V :35(2),Pp :195–200.
- Ertan F. et Balkan B. (2007). Production of α -Amylase from *Penicillium chrysogenum* under Solid-State Fermentation by Using Some Agricultural By-Products.*Food Technol.Biotechnol.* 45 (4), P: 439-442.
- Félix C., Meneses R. S., Goncalves M. F., Tilleman L., Duarte A. S., Jorrinnovo J. V., et al.. (2019). A multi-omics analysis of the grapevine pathogen *Lasiodiplodia theobromae* reveals that temperature affects the expression of virulence- and pathogenicity-related genes. *Sci.* 9 :1–12.
- Fernandez A.J., Villadas P.J., Cabanás G., Valverde-Corredor A., Mercado-Blanco J.,et Fernández-López M. (2019). Defining the root endosphere and rhizosphere microbiomes from the World Olive Germplasm Collection. *Scientific Reports.* 9(1)
- Frac, M., Weber, J., Gryta, A., Dêbicka, M., Kocowicz, A., Jamroz, E., et al.(2018). Microbial functional diversity in podzol ectohumus horizons affected by alkaline fly ash in the vicinity of electric power plant. *Geomicrobiol. J.* 34,579–586.
- Gupta R., Gigras P., Mohapatran H., Goswami K.V., Chauhan B. (2003). Microbial α amylase: a biotechnological perspective. *Process Biochem* 38: 1599-1616.
- Hallsworth JE, 2018. Stress-free microbes lack vitality. *Fungal Biol* 122, 379–385. 1

- Höfer, M., Becker, J.U., Brand, K., Deckner, K., and Betz, A. (1969). A study of the enzyme equipment of the yeast *Rhodotorula gracilis*, *FEBS Letters* 3(5):322-324.
- Ibrahim ,K.M. (2010). The role of date palm tree in improvement of the environment. 116:777–778.
- Jain, K.K.; Kumar, A.; Shankar, A.; Pandey, D.; Chaudhary, B.; Sharma, K.K,2019. De Novo Transcriptome Assembly and Protein Profiling of Copper-Induced Lignocellulolytic Fungus *Ganoderma Lucidum* MDU-7 Reveals Genes Involved in Lignocellulose Degradation and Terpenoid Biosynthetic Pathways. *Genomics*.
- Jamro MMR (2020) .Production and quality of Date fruit in response to pollination methods. *PAB*. 9(3).
- Keesstra S., Nunes J., Novara A., Finger D., Avelar D., Kalantari Z., Cerdà A.(2018) .The superior effect of nature-based solutions in land management for enhancing ecosystem services. 610: 997–1009.
- Kumar A.G., Nagesh N., Prabhakar T.G., Sekaran G. (2008a). Purification of extracellular acid protease and analysis of fermentation metabolites by *Synergistes* sp. Utilizing proteinaceous solid waste from tanneries. *Bioresour. Technol.*, 99; 2364–2372.
- Li, Z.; Fu, J.; Zhou, R.; Wang, D. (2018) .Effects of phenolic acids from ginseng rhizosphere on soil fungi structure, richness and diversity in consecutive monoculturing of ginseng. 25, :1788–1794.
- Liese A, Seelbach K, Wandrey C. *Industrial Biotransformations: a collection of process*. Wiley-VCH; Weinheim: 2006.
- Luzoni ,F., Pagal M., et Reelo V. (2004). Major fungal. Lineages are derived from lichensymbiotic ancestors. *Nature*, 411: 937-940.
- Mala, B.R., Aparna, M.T., Mohini, S.G., Vasanti, V.D. (1998). Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiol Mol Biol Rev*. 62: 597-635.
- Mares, D., (1982). Ultrastructural and cytochemical study of *Rhodotorula glutinis*; in the main growth phases. *Mycopathologia* 80(3):179-188.
- Maria G L, Sridhar K R & Raviraja N S (2005), Antimicrobial and enzyme activity of mangrove endophytic fungi of southwest coast of India. *Journal of Agricultural Technology*, Vol 1 (1), pp67-80
- Martínez ,T .A., Arreguín Rangel L., García, Rivero M., & Aguilar Osorio G. (2011). Use of fruit residues for pectinase production by *Aspergillus flavipes* FP-500 and *Aspergillus terreus* FP-370. *Letters in applied microbiology*, 53(2), 202-209.
- McNear Jr, D.H (2013). The rhizosphere – roots, soil and everything in between. *Nature Education Knowledge*; 4(3):1.
- Mohammed IA, Mohamed IA. 2019. Validation of RAPD and ISSR markers used for sex determination in date palm grown under Sudan conditions. 3(1):17–22.
- Mohamed Mahmoud F., 2017 - Activités biologiques de champignons endophytes isolés du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.), p191. Ecole Nationale Supérieure d’Agronomie
- Moraleda-Muñoz A, Shimkets LJ,2007. Lipolytic enzymes in *Myxococcus xanthus*. *J Bacteriol*. 189(8):3072–80.
 - Mutsui, Y. 1991. *Fusarium* infection (in Japanese). *Ophthalmology*, 33:1333-1339.
 - Pedrolli, D.A. Carmona, E.C. (2009). Pectin lyase from *Aspergillus giganteus*: comparative study of productivity of submerged fermentation on citrus pectin and orange waste. *Appl. Biochem. Microbiol*. 45, 610–616.

- Purayil ,F.T, Robert GA, Gothandam KM, Kurup SS, Subramaniam S, Cheruth AJ.(2018) Genetic variability in selected date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cultivars of United Arab Emirates using ISSR and DAMD markers. *3 Biotech.* 8(2):p 109.
- RADI ., J. MATER., 2014., CODEN: JMESC N ., ISSN : 2028-2508 p.
- Sablonnier, B., 2002. *Biologie microbienne [Microbial biology]*. pp. 157-202.
- Sahoo D.K., Das A., Thatoi H., Mondal K.C., Mohapatra P.K. (2012). Keratinase production and biodegradation of whole chicken feather keratin by anewly isolated bacterium under submerged fermentation, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 167 : 1040-1051.
- Sathya R., Pradeep B.V., Angayarkanni J., Palaniswamy M. (2009). Production of milk clotting protease by a local isolate of *Mucor circinelloides* under SSF using agroindustrial wastes. *Biotechnol. Bioproc. Eng.*, 14; 765-794.
- Schmidt M, Bornscheuer UT. (2005).High-throughput assays for lipases and esterases. *Biomol Eng.* 22:51–56.
- Schröter, A. and Kopperschläger, G. (1996). 6-Phosphofructo-1-kinase from the lipid-accumulating, non-fermentative, red yeast *Rhodotorula glutinis*. *FEMS Microbiology Letters* 142(2-3):247-252.
- Shinde, R., Mantur, B., Patil, G., Parande, M., and Parande, A., (2008). Meningitis due to *Rhodotorula Glutinis* in an HIV infected patient.,*Indian Journal of Medical Microbiology* 26:375-397.
- Sidra, B. Javaid, M. Naqvi, S.M.S. Raja, T.M.A. Guffar, M.G. Saqib, H.H. (2013). Production and partial purification of pectin lyase by *Aspergillus niger* grown on orange peels. *Afr. J. Microbiol. Res.* 7 (13), 1144–1149
- Skoczinski P, Volkenborn K, Fulton A, Bhadauriya A, Nutschel C, Gohlke H, Knapp A, Jaeger KE, 2017.Contribution of single amino acid and codon substitutions to the production and secretion of a lipase by *Bacillus subtilis*. *Microb Cell*,V16(1),pp :160.
- Tyler, L.; Bragg, J.N.; Wu, J.; Yang, X.; Tuskan, G.A.; Vogel, J.P.(2010). Annotation and Comparative Analysis of theGlycoside Hydrolase Genes in *Brachypodium Distachyon*. *BMC Genom.* 11 (600).
- Vincent D., Rafiqi M., Job D. (2020). The multiple facets of plant-fungal interactions revealed through plant and fungal secretomics. Pp 10:1626, 10.3389
- Watanabe T., 1937, *Pictorial atlas of soil and seed fungi: morphologies of cultured fungi and key to species*. 2nd ed, London, 486.
- Wisplinghoff ,H., Seifert ,H., Wenzel ,RP., Edmond, MB. (2003) Current trends in the epidemiology of nosocomial bloodstream infections in patients with haematological malignancies and solid neoplasms in hospitals in the USA. 36:1103–1110.
- Yadav, S. et al (2008). Purification and characterisation of an acidic pectin lyase produced by *Aspergillus ficuum* strain MTCC 7591 suitable for clarification of fruit juices. *Ann. Microbiol.* 58, 61–65.
- Zango O, et al. Genetic diversity of Southeastern Nigerien date palms reveals a secondary structure within Western populations. *Tree Genet Genomes.* 2017;13(4):75. doi: 10.1007/s11295-017-1150-z.
- Zeni ,J., Pili J., Cence K., Toniazzo G., Treichel H., & Valduga E. (2015). Characterization of novel thermostable polygalacturonases from *Penicillium brasilianum* and *Aspergillus niger*. *Bioprocess and biosystems engineering.* 38 (12), 2497-2502.

Références bibliographiques

- Zougari E ,B., Sanaa M., Labidi S. et Lounès-Haj Sahraoui A., 2012. Evaluation de l'impact de la mycorhization arbusculaire sur la nutrition minérale des plantules de palmier dattier. *Etude et Gestion des Sols*, 19(3): 193-202.

ANNEXES

Annexe 1 :

la taxonomie de *Phoenix dactylifera* L .

appartient au domaine : Eukarya (Eucaryotes), règne : Plantae (Plantes) , sous-règne : Tracheobionta (Trachéophytes), phylum : Spermatophytes, classe: *Liliopsida* (Monocotylédones) , sous-classe : Arecidae, ordre : Arecales, famille : Arecaceae ou Palmae, sous-famille : Coryphoideae, tribu : Phoeniceae, genre : Phoenix. (Cronquist .,1991)

Annexe A :

Composition des milieux de culture utilisés pour un litre de milieu :

1/ Milieu de culture PDA (Potato Dextrose Agar) : (Jonsthor et Booth, 1983)

- Pomme de terre 200 g
- Glucose 20 g
- Agar 15 g
- Eau distillée 1000 ml
- pH 6 autoclavage 20 min à 120°C

2/Milieu de production de chitinase :

- Pomme de terre 200 g
- Chitine 20 g
- Agar 15 g
- Eau distillé 1000 ml
- pH 6 autoclavage 30 min à 100°C

Annexe B:

Milieu de culture GYP : (Maria et al., 2005)

- Glucose 1 g
- Extrait de levure 0,1g
- Peptone 0,5g
- Agar 16 g
- Eau distillée 1000 ml

- pH 6 autoclavage 30 min à 100°C

Milieu de production d'amylase :

- Milieu minimum de GYP + 2 % d'amidon soluble

Milieu de production de protéase :

- Milieu GYP + 0,4 % de gélatine additionné de 0.2 g de bleu de bromophénol

Annexe C :

Milieu de culture M9 Agar : (Miller, 1974)

- Na₂HPO₄ 6 g
- KH₂PO₄ 3 g
- NaCl 0,5 g
- NH₄Cl 1 g
- Eau doublement distillée 1000 ml
- Agar 20 g
- pH 6.8 autoclavage 30 min à 100°C

Milieu de production de pectinase : (Cattelan et al., 1999)

- Milieu minimum M9 agar + 10 g de pectine +1,2 d'extrait de levure additionné de 0.2 g bleu bromophénol

Annexe D :

Milieu de culture Pepton agar medium : (Maria et al., 2005)

- Peptone 10 g
- NaCl 5 g
- CaCl₂ 2H₂O 0,1 g
- Agar 16 g
- Eau distillée 1000 ml
- pH 6 autoclavage 30 min à 100°C

Milieu de production de Lipase :

- Milieu Pepton agr medium+ 10g de Tween 20 additionné de 2ml bleu bromophénol.

Milieu de production d'Estérase :

- Milieu Peptone agar medium + 10g de Tween 80 additionné de 2ml bleu bromophénol.

Annexe E :

Milieu de production de phosphatase

Milieu de culture PVK : (Pikovskaya, 1948) :

- $(\text{NH}_2)_2\text{So}_4$ 0,5 g
- Extrait de levure 0,5 g
- Phosphate bicalcique 5 g
- KCL 0,2 g
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,1 g
- Glucose 10 g
- Agar 17 g
- MnsSO_4 trace
- FeSO_4 trace
- 0.2g de Bleu bromophéno
- Eau distillée 1000 ml
- pH 6.7 autoclavage 30 min à 100°C