



N°Ref :.....

Centre Universitaire Abdelhafid Boussouf-Mila

Institut des Sciences et de la Technologie

Département des Sciences de la Nature et de la Vie

Mémoire préparé En vue de l'obtention du diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Science Biologique

Spécialité : Biochimie Appliquée et Microbiologie Appliquée

Thème :

Étude de l'activité antibactérienne des souches fongiques isolées d'un sol thermal

Présenté par : Chouarfa Afaf
Amzel Warda

Devant le jury composé de :

Mr. Kellab Rabeh

Président

MAA Centre Universitaire de Mila

Mme. Amari Bidi Salima

Examinateur

MAA Centre Universitaire de Mila

Mme. Benseradj Ouafa

Promoteur

MCB Centre Universitaire de Mila

Année Universitaire: 2020/2021

Remerciements

En guise de reconnaissance ; nous remercions الله qui nous a donné le courage ; qui nous guidé tout au long de nos études.

Nous commençons par exprimer notre profonde reconnaissance et nos vifs remerciements à Madame : **Benserradj Ouafa** qui nous a honoré en acceptant de diriger ce travail, pour ses encouragements, ses conseils, sa disponibilité et surtout pour sa patience dans l'encadrement de ce mémoire. Nous avons été satisfaits de sa qualité exceptionnelle d'une bonne enseignante, Merci de nous avoir guider avec patience et d'avoir consacré autant d'heures pour les corrections de ce manuscrit, veuillez trouver ici toutes les expressions de notre profonde gratitude et nos sentiments de respect.

Nos remerciements s'étendent également les membres de jury ainsi que monsieur **Kellab Rabeh** et madame **Amari Bidi Salima** pour leur contribution à l'évaluation de notre travail.

Nos remerciements s'étendent également à tous nos enseignants durant nos études universitaires.

Nous remercions tous les membres du « Laboratoire 08 de biologie du centre universitaire de Mila »

Nos remerciements vont également à tous ceux qui ont contribué de loin ou de près à la réalisation de ce travail.

A tous, nous disons Merci.

Afaf et warda



*D*édicaces

Avant tout je remercie Dieu qui m'a donné la puissance, la santé, la volonté et le courage pour achever ce travail.

Je dédie ce modeste travail :

*À la plus douce et belle femme au monde ; à ma formidable maman «**Djeida**» qui m'a tout donné. Je te remercie du fond de mon cœur et je t'aime infiniment et mon très cher père «**Abd elkader**».*

*Un grand merci à mon mari «**Houssam eddine** »*

*Et à mon binôme «**Warda**».*

Qui ont prodigué soin, écoute et assistance.

*À mes adorables sœurs «**Ikhlas, Amani et Amira**».*

*À mes chers : grand-père **Lakhder**, et grande mère*

***Messaouda** pour leurs soutient.*

*À mon père : «**Mohiddine**».*

*À mes tantes «**Noura et Ghania**»*

*À mes familles «**Chouarfa, Boudjellal et Ben Bekhma**»*

*À mes meilleurs amies «**Mouna et Wissam** ».*

Afaf



Dédicaces

Avant tout, nous remercions le mon ^{Allah} tout puissant qui nous a donné la santé, la force, le courage et la volonté pour réaliser ce travail.

Je dédie ce travail à :

*A mes chers parents **Mohammed** et **Farida**, Aucune dédicace ne saurait exprimer ma reconnaissance, mon respect, mon amour et ma considération pour les sacrifices que vous avez consentis. Mon instruction et mon bien être. Puisse dieu le tout puissant vous accorde sante et longue vie.*

*Et à mon binôme **Afaf** pour tous leurs efforts consentis et leur soutien.*

*A mes chères sœurs **Hayat** et **Meriem**, et mes frères **Es-Sadiq** et **Youcef**. Et la femme de mon frère **Chahra**.*

*A mon cher grand père **Lakhder** et à mes chers grands-mères **Fatima** et **Zehira**, et mes tantes **Khadra**, **Khadija** et **Fadila** pour tous leur soutien.*

Et les enfants:

Islam, Oday, Tasnim, Hayder et Safwan

*A mes copines : **Sara, Khawla, Messaouda, Somia, Afaf, Samah, Amina.***

Warda

Liste des figures

Figure 01	Cycle de vie des moisissures	8
Figure 02	Classification des moisissures	9
Figure 03	Le site de prélèvement à hammam Yahia Beni Guecha	18
Figure 04	Préparation des dilutions	19
Figure 05	Ensemencement des moisissures	20
Figure 06	Purification des moisissures	21
Figure 07	Préparation de l'extrait des souches fongique	23
Figure 08	Extraction des métabolites secondaires fongiques bruts	24
Figure 09	Test de l'activité antibactérienne par technique de cylindre agar	26
Figure 10	Test de l'activité antibactérienne par technique de disque	26
Figure 11	Test de l'activité antibactérienne par technique de puits	27
Figure 12	Pourcentage des genres fongiques isolés du sol de hammame Beni Guecha	36
Figure 13	Résultats attendus après réalisation des tests par technique du disque	37
Figure 14	Activité antibactérienne des quatre souches fongiques par la technique des cylindres d'agar avec les bactéries	38
Figure 15	La variation de la zone d'inhibition entre la souche <i>Asperjellus flavus</i> et les différentes bactéries tests	40
Figure 16	La variation de la zone d'inhibition entre la souche <i>Penicillium sp</i> et différentes bactéries tests	41
Figure 17	La variation de la zone d'inhibition entre la souche <i>Alternaria sp</i> et différentes bactéries tests	42
Figure 18	La variation de la zone d'inhibition entre la souche <i>Alternaria alternata</i> et différentes bactéries tests	43
Figure 19	Activité antibactérienne des quatre souches fongiques par la technique des disques	44
Figure 20	La variation de la zone d'inhibition entre la souche <i>A. flavus</i> et différentes bactéries tests	46
Figure 21	La variation de la zone d'inhibition entre la souche <i>Penicillium Sp</i> et les différentes bactéries tests	47
Figure 22	La variation de la zone d'inhibition entre la souche <i>Alternaria Sp</i> et les différentes bactéries tests	48

Figure 23 La variation de la zone d'inhibition entre la souche <i>Alternaria alternata</i> et différentes bactéries tests	49
Figure 24 Activité antibactérienne des quatre souches fongiques par la technique des puits	50
Figure 25 La variation de la zone d'inhibition entre la souche <i>A. flavus</i> et les différentes bactéries tests	52
Figure 26 La variation de la zone d'inhibition entre la souche <i>Penicillium sp</i> et les différentes bactéries tests	53
Figure 27 La variation de la zone d'inhibition entre la souche <i>Alternaria sp.</i> et différentes bactéries tests	54
Figure 28 La variation de la zone d'inhibition entre la souche <i>Alternaria alternana</i> et les différentes bactéries tests	55

Liste des tableaux

Tableau 01	Les bactéries tests	25
Tableau 02	Etude Macroscopique des souches fongiques isolées à partir du sol	30
Tableau 03	Etude Microscopique des souches fongiques isolées à partir du sol	33
Tableau 04	L'activité antibactérienne par technique de cylindre agar des isolats, vis-à-vis des quatre bactéries test	38
Tableau 05	L'activité antibactérienne par technique du disque des isolats, vis-à-vis des quatre bactéries test	44
Tableau 06	L'activité antibactérienne par technique des puits des isolats, vis-à-vis des quatre bactéries test	51

Liste des abréviations

g	Gramme
Mg	Milligramme
L	Litre
ml	Millilitre
MSFB	Métabolites secondaires fongiques brutes
mm	Millimètre
%	Pourcentage
H	Heure
Min	Minute
PDA	Potatoes dextrose Agar
PDB	Potatoes dextrose broth
Cm	Centimètre
µm	Micromètre
CMI	Concentrations minimales inhibitrices
CEC	capacité d'échange cationique
pH	Potentiel d'hydrogène
H	Hydrogène
°C	Degré Celsius
Aw	Activité de l'eau
PCR	Polymerase Chain Reaction
ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
C G	Base azotique
<i>B, cereus</i> ;	<i>Bacillus cereus</i>
<i>E, coli</i>	<i>Escherichia coli.</i>
<i>P, aeruginosa</i>;	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>S, aureus.</i>	<i>Staphylococcus aureus.</i>
<i>A, flavus</i>	<i>Aspergillus flavus</i>
<i>A, niger</i>	<i>Aspergillus niger</i>

Table des matières

Introduction	1
--------------	---

Revue Bibliographique

Chapitre 01 le sol

1. Définition du sol	3
2. Les micro-organismes du sol	3
3. Les propriétés physico-chimiques du sol	4
3.1. Les propriétés physiques du sol	4
3.2. Les propriétés chimiques de sol	5

Chapitre 02 les moisissures

1. Généralités	7
2. Le cycle de vie des moisissures	7
3. Classification des moisissures	8
4. Conditions de croissance	9
4.1. Besoins nutritifs	9
4.2. Les conditions environnementales	10
5. Identification des moisissures	12
5.1. Identification morphologique	12
5.2. Identification génétique	13
6. Rôle des moisissures	14
6.1. Rôle dans l'industrie alimentaire	14
6.2. Rôle dans l'industrie pharmaceutique	14
6.3. Rôle phytosanitaire	15
7. Tolérance des mycètes à la haute température	15
8. Production des métabolites secondaires par les moisissures	15
8.1. Les mycotoxines	16
8.2. Les antibiotiques	16
8.3. Mécanisme d'action des substances antibactériennes	17

Partie Pratique

Matériel et méthodes

1. Le site d'étude	18
2. Isolement des champignons du sol	18

2.1.	Échantillonnage	18
2.2.	Préparation de la solution mère	19
2.3.	Milieu de culture des moisissures	19
2.4.	Préparation des dilutions	19
2.5.	Méthode d'isolement	19
2.6.	Ensemencement des moisissures	20
2.7.	Repiquage et purification des moisissures	21
3.	Identification des souches fongiques	21
3.1.	Identification macroscopique	21
3.2.	Identification microscopique	22
4.	La fermentation des souches obtenues	25
5.	Mise en évidence de l'activité antibactérienne des souches obtenues	25
5.1.	Préparation des bactéries tests	25
5.1.1.	Bactéries tests	25
5.1.2.	Réactivation de bactéries tests	26
5.2.	Les tests de l'activité anti bactérienne	26
5.2.1.	Technique des cylindres d'agar	26
5.2.2.	Technique des disques	26
5.2.3.	Technique des puits	27

Résultats et discussions

1.	Isolement des champignons du sol	29
2.	Identification des souches	29
2.1.	Etude macroscopique	29
2.2.	Etude microscopique	32
3.	Etude de l'activité antibactérienne	36
3.1.	Technique des cylindres d'agar	37
3.2.	Techniques des disques et des puits	43
3.2.1.	Technique des disques	43
3.2.2.	Techniques des puits	49
	Conclusion	57
	Références Bibliographiques	59
	Annexes	69

Introduction



Les bactéries pathogènes sont responsables de plusieurs maladies épidémiques et pandémiques (Moroh, 2013). Ils sont des organismes unicellulaires microscopiques. Il en existe des milliers de types différents, et elles vivent dans tous les environnements possibles, partout dans le monde (Larry et Bush)

Dans certains cas, l'agent causal d'une maladie est hautement spécifique : telle maladie ne peut être causée que par l'espèce appropriée, ou seulement par des souches particulières de cette espèce (Paul *et al.*, 2004). *Pseudomonas aeruginosa* est un pathogène opportuniste peuvent provoquée des infections endogènes ou exogène (Grosjean *et al.*, 2011). *Bacillus cereus* est un germe saprophyte, rarement pathogène pour l'homme, plus signalées des infections graves (endocardite, septicémie, pneumonie) (Carip, 2008). De nombreuses infections provoquées par *Escherichia coli* peuvent se rencontrer, certaines localisées aux voies digestives et autre aux voies urinaires (Berche *et al.*, 1989). *Staphylococcus aureus*, est une bactérie ubiquitaire, flore résidente de la peau de l'homme et des animaux (Grosjean *et al.*, 2011) elle provoque des Infection suppuratives de la : peau, tissu mou, muscle, os, tractus respiratoire, valve cardiaque et tractus urinaire.

A partir d'une succession d'observation et de travaux de nombreux chercheurs dont Pasteur, Joubert, Duchesne, la quête a abouti à la découverte des antibiotiques, depuis cette découverte, les antibiotiques ont permis de grandes avancées en thérapeutique et contribué à l'essor de la médecine moderne (Moroh, 2013).

Ces antibiotiques ou métabolites secondaires sont des acteurs importants du monde microbien. Ils sont impliqués dans une multitude de processus biologiques de l'environnement. La grande découverte de Fleming qui a remarqué un phénomène inhabituel sur une ancienne plaque de culture de *Staphylococcus aureus* (Fleming, 1929). Un champignon contaminant, *Penicillium notatum*, avait inhibé la croissance bactérienne des staphylocoques en libérant un agent antibactérien dans la zone adjacente à sa croissance, Il a ainsi attribué le nom «pénicilline» à ce composé inhibiteur en raison de sa provenance.

En 1940, White a signalé qu'une souche d'*Aspergillus flavus*, cultivée sur certains milieux liquides, ont donné des filtrats qui ont montré une activité antibactérienne contre certaines bactéries Gram-négatif et Gram-positif (Edwin *et al.*, 1942). Glistler (1941) a également rapporté avoir obtenu un puissant concentré antibactérien d'un *Aspergillus flavus*, mais apparemment pas sous forme cristalline pure.

La connaissance des champignons a fait de large progrès ces dernières années, l'extraordinaire potentialité des champignons appliqués aux grands secteurs industriels, est illustré par la biotechnologie fongique (Bouchet, 2005). Ils ont une capacité de sécréter différents métabolites secondaires. Ces substances ont été identifiées comme étant importantes au processus d'assimilation fongique de substances nutritives, incluant des enzymes fongiques (Pasqualatto, 2008). Malgré le progrès continu de la science, la connaissance de la biologie des moisissures reste partielle.

Dans les milieux extrêmes serait fort probable d'au temps plus, qu'il a été prouvé que les moisissures isolées à partir des milieux extrêmes (sol proche d'une source thermale), peuvent synthétiser plus de métabolites secondaires caractérisés par une stabilité biologique et chimique (Frisvad, 2005).

De ce fait l'objectif principal du présent travail consiste à l'étude de l'activité antibactérienne des moisissures isolées a partir du sol d'une source thermale de hammam Yahia Beni Guecha à la wilaya de Mila.

Pour ce faire, ce travail comporte les parties suivantes: Une synthèse bibliographique approfondie contenant des informations relatives aux sols, moisissures thermophiles, bactéries pathogènes testés. Une étude expérimentale scindée en quatre parties ; la première partie repose sur l'isolement et l'identification des moisissures à partir des échantillons du sol proche de la source thermale de hammam Yahia Beni Guecha à la wilaya de Mila vis-à-vis des bactéries pathogènes, alors que la deuxième partie porte sur l'évaluation de l'effet antibactérien des espèces fongiques isolées.

Le mémoire se termine par des résultats qui ont fait l'objet d'une discussion approfondie et enfin, une conclusion qui ouvre des perspectives de recherche sur le thème étudié

*Revue
Bibliographique*



Chapitre I

Le Sol



1. Définition du sol

Le sol est défini comme la couche supérieure de la croûte terrestre composée de particules minérales, de matières organiques, d'eau, d'air et d'organismes (NF ISO 15799, 2004). Il est une zone d'échanges entre la biosphère et la lithosphère, le sol est un milieu vivant, complexe et sensible aux contraintes.

Pour les géologues, le sol est la partie superficielle de la roche mère altérée par les conditions climatiques, biologiques et anthropiques. Pour les agriculteurs, le sol est simplement un milieu riche qui permet la récolte de nombreux produits végétaux. C'est un milieu vivant, sur un support organique et minéral solide. Le sol est une ressource naturelle essentielle, utilisée dans plusieurs secteurs d'activité tels que l'industrie, l'agriculture et l'urbanisme. (Navel, 2006).

Cependant le sol est un milieu vivant, complexe et dynamique, en évolution constante sous l'effet de différents paramètres tels que le climat, la topographie, la végétation et l'action de l'homme. Il joue un rôle d'interface entre les phases liquides et gazeuses dans l'environnement où il intervient comme système source, système transformateur, et système de transfert des éléments en trace. (Berthelin et Leyval., 2000).

2. Les micro-organismes du sol

Le sol constitue un milieu particulièrement favorable à la vie, l'humidité, l'air et les matières organiques diverses permettent le développement et la conservation d'une multitude d'organisme vivant (Diehl, 1974).

On peut considérer la microflore du sol comme étant à la fois transformateur d'espèces appartenant aux groupes suivants : Bactéries, actinomycètes, champignons, algues et protozoaires (Dommergues, 1977).

Les sols peuvent contenir de très fortes populations microbiennes. Dans un sol de surface la population bactérienne mesurée au microscope, peut approcher les 10⁸ 10⁹ cellules par gramme de poids sec de terre. (Prescott et *al.*, 1999).

A. Bactéries

Les bactéries sont les microorganismes les plus abondants et métaboliquement les plus actifs du sol. En fonction des propriétés du sol, tous les types physiologiques bactériens sont représentés : autotrophes et hétérotrophes, mésophiles, thermophiles et psychrophiles, aérobies et anaérobies.

Les bactéries connus pourraient être isolés d'un échantillon du sol, si les techniques et les milieux adéquats sont utilisés. Le sol est le réceptacle d'apport continu de microorganismes exogènes qui ou survivent en situation de dormance.

Les genres les plus communément isolés sont. *Arthrobacter*, *Pseudomonas*, *Achromobacter* et *Bacillus*, dans les couches aérobies alors que les bactéries du genre *Clostridium* sont dominantes dans les conditions anaérobies.

B. Champignons

Les champignons du sol forment une biomasse aussi importante que celle des bactéries. Leurs activités métaboliques sont multiples et fondamentales à l'équilibre écologique des sols, Par :

- Leurs interactions avec les systèmes racinaires des plantes.
- Leur aptitude de colonisation et de dégradation des débris organiques de grande taille et des composés de structures complexe.

De nombreux travaux indiquent la prédominance de *Trichoderma* et *Aspergillus*, alors que *Rhizopus*, *Fusarium*, *Zygorhynchus*, *Cephalosporium*, *Cladosporium* et *Verticillium* sont couramment isolés.

C. Algues et protozoaires

Les algues sont considérées comme relativement peu abondantes dans le sol. Mais leur présence est cependant commune. Les algues du sol incluent des espèces coccoïdes ou filamenteuses.

Les groupes les plus courants sont des *Chlorophyceae*. Parmi les microorganismes photosynthétiques du sol, les Cyanobactéries sont dominantes dans les sols neutres et alcalins, alors que les algues sont les plus communes dans les sols acides.

Les protozoaires isolés des sols sont variés et se développent dans les zones superficielles humides, au niveau des films d'eau entourant les particules. (Benahmed M, 2017).

3. Les propriétés physico-chimiques du sol

3.1. Les propriétés physiques du sol

Le sol est un écosystème complexe, un bioréacteur et un filtre indispensable à la vie sur terre. Il possède des propriétés physiques caractérisées par sa structure et sa texture.

- La structure du sol est une caractéristique dynamique qui se réfère à l'arrangement des particules solides. Elle définit la porosité du sol, c'est à dire l'espace poral qui peut être rempli d'eau et d'air. Le volume poral varie dans l'espace et dans le temps en fonction des conditions agro-environnementales et des propriétés du sol.

- La texture d'un sol correspond à la proportion des différents constituants minéraux solides d'un sol (argile, sable, limon...). Elle représente la distribution des particules élémentaires en fonction de leur diamètre. (Darcheville, 2008).

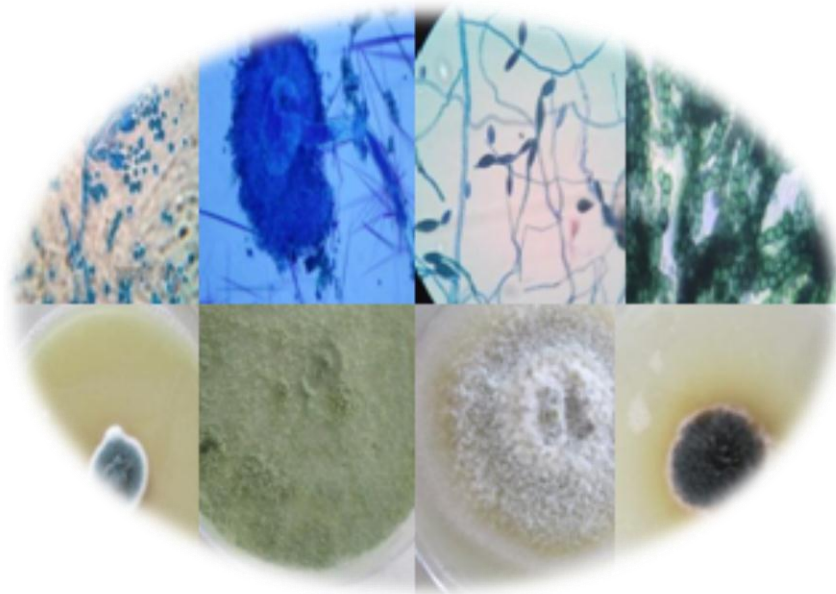
3.2. Les propriétés chimiques de sol

Le sol est une matrice réactive qui est composée d'éléments chargés, minéraux et organiques. Ces éléments interagissent entre eux et confèrent au sol des propriétés chimiques qui interviennent entre autres, dans la nutrition des plantes. (Mumen, 2006).

- Les ions présents dans les sols proviennent essentiellement des processus de dégradation de la roche mère et de minéralisation de la matière organique.
- Le complexe argilo-humique ou complexe adsorbant est le résultat de l'association de l'humus et des argiles.
- La capacité d'échange cationique (CEC) est la quantité totale de cations qu'un poids déterminé de sol.
- Le pH l'acidité, exprimée par le pH, est définie par la concentration d'ions H^+ qui sont fixés sur le complexe argilo-humique ou en mouvement dans la solution du sol. (Mumen, 2006).

Chapitre II

Les moisissures



1. Généralités

Les champignons, ou les mycètes, sont des organismes eucaryotes uni-ou pluricellulaires incluant des espèces macroscopiques (macromycètes) et d'autres microscopiques (micromycètes) d'aspect filamenteux ou lévuriforme. Ces derniers peuvent devenir visibles lorsque leur développement est important. Ces champignons sont appelés couramment « Moisissures ». (Cahagnier et Richard-Molard, 1998).

Le terme « moisissure » désigne tous les champignons microscopiques filamenteux présents dans l'environnement tant à l'extérieur qu'à l'intérieur. L'appareil végétatif appelé « thalle » n'est pas constitué de véritables tissus, il ne comporte ni racine, ni tige, ni feuille, à l'inverse des plantes. Ce thalle est constitué d'un réseau filamenteux appelé mycélium.

Les moisissures (champignons microscopiques), présentes dans tous les environnements contribuent, avec d'autres micro-organismes. (Tony B et Caroline L, 2011).

Il s'agit d'organismes hétérotrophes (nécessitant une source de carbone et d'azote pour leur développement) et ubiquistes. (Cahagnier et Richard-Molard, 1998).

Ce sont des micro-organismes eucaryotes, dont les cellules s'allongent pour former des filaments d'environ 2 à 12 µm de diamètre, coenocytiques (non cloisonnés) ou septés (cloisonnés).

L'enchevêtrement des filaments donne naissance à un mycélium visible à l'œil nu sur les milieux de culture (colonie fongique) ou les substrats colonisés (Arnaud C., 2014).

2. Le cycle de vie des moisissures

Le cycle de vie des moisissures est illustré par 4 principales étapes (Figure 01) germination, développement, reproduction et dormance/latence.

Le cycle de vie des moisissures en milieu intérieur débute lorsqu'une spore se dépose sur une surface lui offrant les conditions nécessaires à sa croissance. En fait, la germination se déclenche par la présence d'eau combinée ou non à certains facteurs très spécifiques comme l'intensité lumineuse, certaines températures ou types d'éléments nutritifs. La spore germera alors et donnera naissance à un premier filament non différencié, appelé hyphe, qui s'allongera pour former un ensemble appelé mycélium. Cet ensemble de filaments, plus ou moins ramifiés, constitue le thalle des champignons. En présence de conditions favorables à la sporulation, le mycélium donnera naissance à des structures plus spécialisées, qui produiront des spores asexuées (conidies) ou, plus rarement, des spores sexuées. Chaque moisissure produit un très grand nombre de spores dont l'ensemble, appelé spore, se présente très souvent sous un aspect poudreux et coloré à la surface de la moisissure. La taille, la forme et la couleur des spores de moisissures varient grandement d'une

espèce à l'autre. Par contre, en microscopie, toutes les spores d'une même espèce sont de couleur, de dimension et de forme relativement constante ce qui, dans bien des cas, constitue un élément d'identification taxonomique (ACGIH 1999)

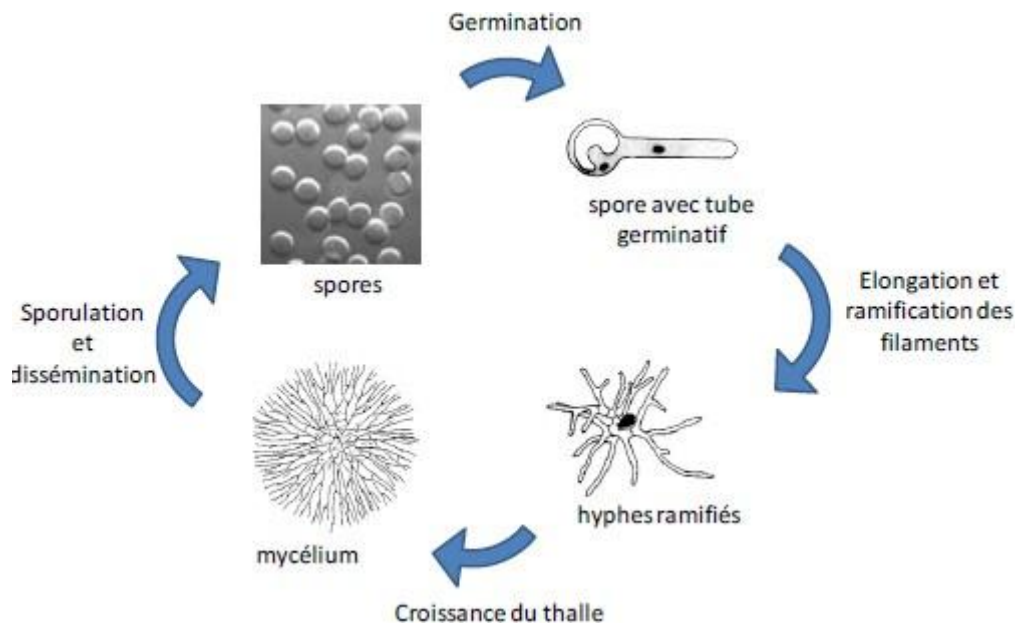


Figure 01 : Cycle de vie des moisissures (www.aspergillus.man.ac.uk)

3. Classification des moisissures

L'ensemble des caractéristiques morphologiques évoquées précédemment a permis le classement des moisissures. Il s'agit d'un véritable règne comprenant des divisions, elles-mêmes subdivisées en classes ; les classes englobent des ordres qui rassemblent des familles ; une famille peut comprendre un ou plusieurs genres et le genre, à son tour, rassemble une ou plusieurs espèces. Chaque champignon porte un nom qui suit les règles de la nomenclature binominale (genre et espèce) énoncées au XVIII^{ème} siècle par Carl von Linné.

Dans le monde des mycètes, c'est en fonction de la modalité de la reproduction des spores qu'on classe les champignons par divisions.

La reproduction peut être à caractère :

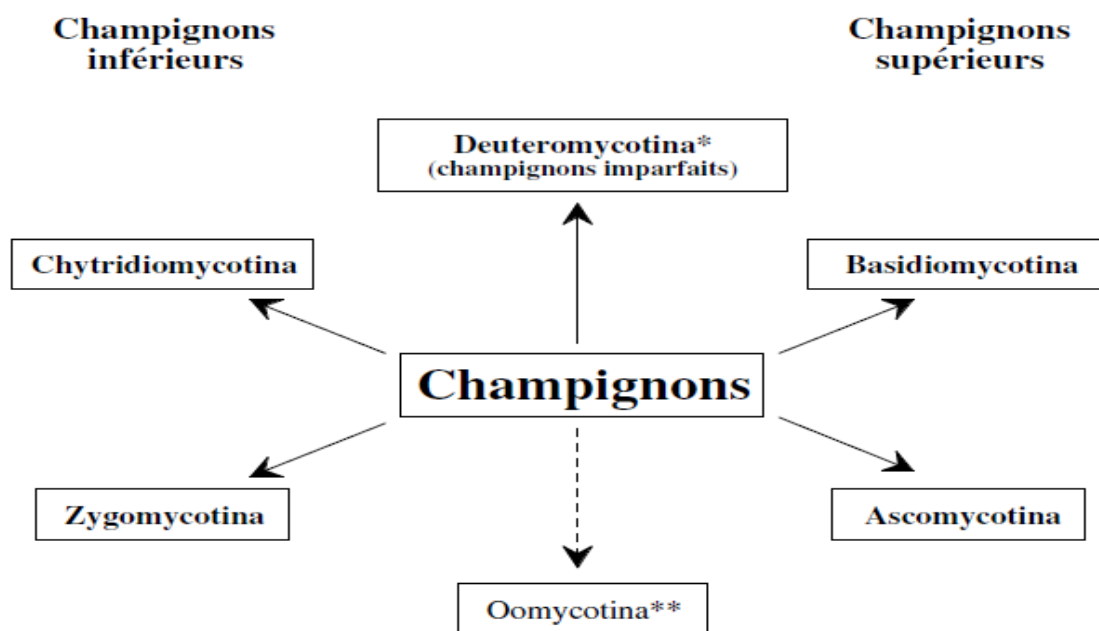
- ✓ Sexué : champignon téléomorphe ou « parfait » ;
- ✓ Et/ou asexué : champignon anamorphe ou « imparfait » ;
- ✓ Les deux formes de reproduction peuvent coexister chez un même champignon qu'on appelle holomorphe.

Basés sur les différentes formes de la reproduction « sexuée », les auteurs classent les champignons en quatre groupes « parfaits » (figure 2) :

- Zygomycota : à spores non flagellées et zygotes ;
- Ascomycota : à spores non flagellées et asques ;
- Basidiomycota : à spores non flagellées et basides.
- Les Chytridiomycota et les Mastigomycotina : à spores flagellées (mobiles) et zygotes.

Les taxonomistes ont créé un groupe artificiel imparfait : les Deutéromycètes. (Chabasse D, et al ; 2002)

- Domaine : Eucaryotes
- Règne : Champignons
- Division : - Ascomycotina
(phylum) - Basidiomycotina
- Zygomycotina
- Chytridiomycotina
- (Deuteromycotina)



* Champignons connus seulement par leur stade asexué, en attente de classification.

** Actuellement les espèces issues de cette division ne sont plus classées parmi les champignons vrais.

Figure 02: Classification des moisissures (Chabasse D, et al ; 2002)

4. Conditions de croissance

4.1. Besoins nutritifs

Les moisissures sont des microorganismes hétérotrophes, elles exigent donc la présence des éléments nutritifs de base (carbone, azote et ions minéraux) dans le milieu qui assure leur croissance. Ils possèdent une panoplie enzymatique extrêmement riche qui leur permet d'utiliser plus efficacement encore que les bactéries les substrats les plus complexes. Leur digestion doit commencer dans le milieu extérieur par des enzymes excrétées (extracellulaires) ou liées à la paroi car seules les molécules de taille relativement petite peuvent franchir les parois et gagner le cytoplasme (Davet, 1996)

- **Source de carbone et d'énergie** : Les mycètes utilisent des substances organiques comme sources de carbone et d'énergie. La grande partie du carbone de l'environnement est sous forme de polymères complexes tels que la cellulose, la chitine et la lignine. Ces polymères doivent être hydrolysés par des enzymes hydrolytiques, libérées par les mycètes, pour avoir une forme soluble et diffusable (la paroi cellulaire rigide empêche l'endocytose) (Nicklin *et al.*, 2000).
- **Source d'azote** : La plupart des champignons filamenteux assimilent l'ammoniaque sous forme de sels (NH_4^+) dont la présence réprime l'utilisation d'autres sources azotées (nitrate, acides aminés, protéines). L'ammoniaque est transformé en acide glutamique, en glutamine ou en d'autres acides aminés par transamination (Boiron, 1996), alors que seules certaines espèces utilisent le nitrate, d'autres ne peuvent croître qu'en présence d'azote organique et aucun champignons filamenteux ne peut fixer l'azote atmosphérique (Punt *et al.*, 2002).
- **Éléments minéraux** : La présence des ions minéraux et métaux dans le milieu de culture est nécessaire pour la croissance et la reproduction de plusieurs espèces fongiques, il s'agit essentiellement de sulfate, de magnésium, de potassium, de sodium et de phosphore avec des concentrations plus au moins différentes selon l'espèce (Uchicoba *et al.*, 2001). Des traces des éléments tels que le fer, le cuivre, le manganèse, le zinc et le molybdène, sont nécessaires à la plupart des champignons filamenteux pour la production des cytochromes, des pigments, des acides organiques, ... etc (Boiron, 1996).

4.2. Les conditions environnementales

- **Température** : La plupart des moisissures se développent entre 15 et 30°C avec une croissance optimale aux environs de 20-25°C. Cependant, il est clair que les moisissures ne se développent pas à distance de cette intervalle, mais leurs spores résistent toujours ; ainsi à la notion de croissance, vient de s'ajouter à celle de la survie. La résistance des spores aux conditions extrêmes est à prendre en considération pour les pays où la saison hivernale est très froide (neige) et également pour les denrées de l'alimentation destinées à la conservation frigorifique ou à l'inverse dans les tunnels de séchage voir à 130°C au four de boulangerie (Moreau C.1976)

En fonction de la température on classe les moisissures en espèces (Moreau C.1976) :

- ✓ **Thermophiles** : 20 et 50°C
- ✓ **Thermotolérants** : se développent à des températures bien inférieures à 20 et qui peuvent supporter une température de 50°C (*Aspergillus niger*).
- ✓ **Nésophiles** : se développent entre 10 et 40°C (*Penicillium chrysoginum*).

- ✓ **Psychrophiles** : se développent entre 5 et 10°C.
- ✓ **Cryophiles** : Se développent à des températures encore plus basses.

- **pH** : Les moisissures se développent mieux en milieu légèrement acide (croissance optimale à des pH entre 4 et 6), mais elles peuvent tolérer des pH très acides (pH = 1). Par ailleurs, le métabolisme des moisissures modifie le pH, soit par l'utilisation des anions ou des cations du milieu, soit en produisant des acides organiques ou de l'ammoniac (Leyral et Vierling, 2001 ; Boiron, 1996).

- **Activité de l'eau (Aw)** : C'est un concept physico-chimique, introduit par Scott (1957). Il a été montré qu'il y a une relation entre l'humidité dans l'aliment et la capacité de croissance microbienne. Les mycètes ont besoin de l'eau pour extraire les nutriments et sont donc restreints à des environnements assez humides, comme les tissus d'un hôte, les sols et les substances humides (Nicklin *et al.*, 2000). La plupart des moisissures préfèrent une aw entre 0,85 et 0,99 pour leur développement. L'aw minimal permettant le développement de la plupart des champignons contaminant les céréales est de 0,7. Certaines moisissures xérophiles (*A. flavus* ou *P. restrictis*) peuvent se développer dans les fruits secs, le lait en poudre, les confitures, charcuteries sèches dont l'aw est plus faible. Généralement, les espèces d'*Aspergillus* et de *Penicillium* sont des contaminants typiques des céréales de stockage tandis que les espèces de *Fusarium* préfèrent le milieu dont l'aw est plus élevé. (Nguyen, 2007).

- **Oxygène** : La quantité d'oxygène mise à la disposition des moisissures est un facteur important de développement. La plupart sont aérobies, les plus exigeantes vivent dans les régions périphériques des substrats, les moins exigeants peuvent se développer en profondeur comme *Fusarium oxysporum* et *Aspergillus fumigatus* . Certaines peuvent même supporter une anaérobiose très stricte comme *Neocallimastix* (Bourgeois, 1989; Botton *et al.*, 1999).

- **Lumière** : Elle influence la croissance des moisissures, soit par destruction photochimique des constituants du milieu, soit en agissant directement sur le métabolisme fongique par la stimulation de la biosynthèse de divers pigments (Boiron, 1996).

5. Identification des moisissures

L'identification des très nombreuses espèces fongiques susceptibles de coloniser les aliments et d'en altérer les qualités, voire de produire des mycotoxines est une étape indispensable à l'évaluation du risque mycotoxique.

Cette identification a pendant longtemps été exclusivement basée sur l'observation des caractères cultureux et morphologiques de l'espèce. Les progrès récents de la biologie moléculaire ont permis de proposer des outils d'aide à l'identification. Toutefois, la complexité du règne fongique fait, qu'à l'heure actuelle, ces outils ne peuvent pas encore remplacer complètement l'examen morphologique, qui reste la base de l'identification. (Cahagnier et Richard-Molard, 1998).

5.1. Identification morphologique

5.1.1. Critères d'identification macroscopique

- L'aspect des colonies représente un critère d'identification. Les champignons filamenteux forment des colonies duveteuses, laineuses, cotonneuses, veloutées, poudreuses ou granuleuses ; parfois certaines colonies peuvent avoir une apparence glabre (l'absence ou pauvreté du mycélium aérien).
- Le relief des colonies : il peut être plat ou plissé et la consistance des colonies peut être variable (molle, friable, élastique ou dure).
- La taille des colonies: Elle peut être très variable en fonction des genres fongiques : petites colonies (*Cladosporium*) ou au contraire, colonies étendues, envahissantes (*Mucor*, *Rhizopus*).
- La couleur des colonies est un élément très important d'identification ; les couleurs les plus fréquentes sont le blanc, le crème, le jaune, l'orange, le rouge allant jusqu'au violet ou le bleue le vert, le brun allant jusqu'au noir. Les pigments peuvent être localisés au niveau du mycélium (*Aspergillus*, *Penicillium*) ou diffuser dans le milieu de culture (*Fusarium*).
- Les structures de fructification : la présence ou l'absence, au centre de la colonie, des structures de fructification sexuée (cléistothèces) ou asexuée (pycnides) est aussi un élément important de diagnose (Botton *et al.*, 1990).

5.1.2. Critères d'identification microscopique

L'examen microscopique d'une colonie fongique se fait après réalisation d'un étalement entre lame et lamelle et coloration de la préparation au Bleu Cotton. Généralement, un examen à l'objectif 40 est suffisant pour mettre en évidence la plupart des éléments importants de diagnose (Cahagnier et Richard-Mollard, 1998).

➤ Le thalle :

Tous les champignons possèdent un appareil végétatif constitué de filaments (hyphes) qui ensemble, forment le thalle filamenteux ou le mycélium ; le thalle peut être siphonné ou septé :

- ✓ Le thalle siphonné, constitué d'éléments tubulaires pe ou pas ramifié, de diamètre large et irrégulier (5-15 μm), non cloisonné est caractéristique des *Zygomycètes* ;
- ✓ Le thalle septé ou cloisonné, constitué de filaments de diamètre étroit (2-5 μm) et régulier divisé par des cloisons en articles uni ou pluricellulaires est caractéristique des *Ascomycètes*, *Basidiomycètes* et *Deutéromycètes* (Badillet *et al.*, 1987).

➤ Les spores :

Les spores qui sont le produit de la reproduction asexuée peuvent être endogènes ou exogènes :

- ✓ Les spores endogènes (endospores) sont produites à l'intérieur d'un sac fermé (sporange), porté par un filament spécialisé (sporangiophore). Ces spores, que l'on observe par exemple chez les *Mucorales*, sont libérées par le déchirement de la paroi de sporange à maturité.
- ✓ Les spores exogènes (conidies), retrouvées chez les *Ascomycètes*, *Basidiomycètes* et *Deutéromycètes*, sont formées par bourgeonnement à partir d'une cellule spécialisée (celluleconidiogène).

L'examen des spores et de leur organisation est une étape importante de l'identification fongique (Campbell *et al.*, 1996).

5.2. Identification génétique

De nombreuses études ont visé à développer des méthodes outils d'identification reposant sur l'étude des acides nucléiques (ADN et ARN) et ne nécessitant plus obligatoirement un examen morphologique (Peterson, 2006 ; Hinrikson *et al.*, 2005 ; Feuilhade de Chauvin, 2005 ; Jin *et al.*, 2004 ; Reiss *et al.*, 1998).

Les méthodes les plus intéressantes sont basées sur l'amplification par PCR (polymerase chain reaction) de certaines régions spécifiques comme le gène codant pour la sous-unité 28S ribosomale (région D1-D2) et des régions ITS1 et ITS2 (Hinrikson *et al.*, 2005).

L'identification moléculaire d'espèces fongiques est, à l'heure actuelle, surtout appliquée en mycologie médicale pour différencier les espèces d'intérêt. En effet, les infections fongiques envahissantes sont de plus en plus identifiées comme cause primaire de morbidité et de mortalité particulièrement chez les immunodéficients (de Aguire, *et al.*, 2004).

6. Rôle des moisissures

Sur le plan économique on peut distinguer deux groupes de moisissures, celles qui sont utiles utilisées dans l'industrie pour conférer aux produits des propriétés organoleptiques et technologiques, d'autres nuisibles et toxigènes qui peuvent se développer sur différents substrats et y produire, dans certaines conditions de températures et d'humidité, des molécules toxiques dénommées mycotoxines (Boudra, 2009).

6.1. Rôle dans l'industrie alimentaire

Les moisissures sont souvent dotées de propriétés lytiques importantes (cellulolytiques protéolytiques, etc....) qui en font des agents de dégradation dangereux mais parfois des agents technologiques utilisés dans l'affinage des fromages et dans la production d'enzymes (Guiraud, 1998 ; Guiraud & Rosec, 2004). Selon Webster & Weber (2007), les *Aspergillus* et les *Penicillium* jouent un rôle primordial en biotechnologie grâce à leur aptitude à produire de grandes quantités d'enzymes extracellulaires tels que les protéases, amylases, lipases et pectinases utilisés dans de nombreux processus industriels y compris la fabrication de produits de boulangerie, les produits laitiers, les jus et dans l'industrie de l'amidon.

On note leur rôle utile dans la fabrication de nombreux aliments. Ainsi, des souches sélectionnées de moisissures sont utilisées dans la fabrication du Roquefort (*Penicillium roquefortii*) ou du Camembert (*Penicillium camembertii*) (Delarras, 2007). En outre, d'autres souches appartenant au genre *Aspergillus* interviennent dans la production des sauces de soja dont la matière première est un mélange de grains de soja et de blé, la dégradation de ce substrat est appelée le processus de Koji et consiste l'un des meilleurs exemples pour la fermentation d'un substrat solide où l'on utilise les deux espèces *A.oryzae* et *A.sojae* (Webster & Weber, 2007).

6.2. Rôle dans l'industrie pharmaceutique

Certaines moisissures sont utilisées pour la production d'antibiotiques telle que la découverte de l'activité antibiotique très importante de la pénicilline (Filtenborg *et al.*, 1996) contre les bactéries à gram-négatif, produite naturellement par l'espèce *Penicillium notatum* (Webster & Weber, 2009). Selon Boutibonnes *et al.* (1984), les toxines secrétées par quelques moisissures s'accompagnent également d'un pouvoir antibactérien qui s'exprime préférentiellement sur des espèces du genre *Bacillus*.

6.3. Rôle phytosanitaire

Les champignons entomopathogènes sont bien connus d'être efficaces dans la lutte contre les insectes. Une étude récente de Seye *et al.* (2014) a mis en évidence, pour la première fois, l'effet pathogène de deux moisissures à savoir *Aspergillus flavus* et *A. clavatus* contre le puceron de la fève *Acyrtosiphon pisum* (Harris) et suggère leur utilisation comme agents de lutte biologique contre les aphides.

7. Tolérance des mycètes à la haute température

Parmi les organismes eucaryotes, seulement quelques espèces de mycètes peuvent se développer à des températures situées entre 45 °C et 55 °C (Cooney et Emerson, 1964). En effet, les mycètes thermophiles ont une température de croissance minimale inférieure à 20°C et maximale supérieure à 50 °C (Brock, 1995 ; Blochl *et al.*, 1997 ; Maheshwari *et al.*, 2000). Par ailleurs, Tansey et Brock (1978) ont répertorié 30 espèces fongiques croît à des températures élevées modérément (60°C à 62°C). En outre, la majorité de mycètes thermophiles appartiennent aux Zygomycètes (*Rhizomucor miehi*, *R. pussillus*), Ascomycètes (*Chaetomium thermophile*, *Thermoascus aurantiacus*, *Dactylomyces thermophilus* , *Melanocarpus albomyces*, *Talaromyces thermophilus*, *T. emersonii*, *Thielavia terresteris*), Basidiomycètes (*Phanerochaet chrysosporium*) et Hyphomycètes (*Acremonium almbamensis*, *A. thermophilum*, *Myceliophthora thermophila*, *Thermomyces liginosus*, *Seytalidium thermophilum*, *Malbranchea cinnamonea*) (Tensey and Brock, 1978 ; Mouchacca, 1997 ; 1999).

Sur le plan physiologique, la haute température chez la cellule fongique augmente la fluidité de la membrane et ce par l'augmentation de la proportion des acides gras saturés (Sinensky, 1974 ; Jaenicke, 1996). Par contre, dans des basses températures, la membrane cellulaire contient une proportion plus élevée d'acides gras insaturés (Sinensky, 1974). En effet, il a été trouvé que, le degré de non saturation des acides gras de la couche phospholipidique de la membrane est de 0.88 chez les mycètes développés à 50°C, et de 1.06 chez les mêmes mycètes développés à 30°C (Rajasekaram and Maheshwari, 1990). Par ailleurs, il a été démontré que chez les mycètes thermophiles, l'ADN contient plus de liaisons G-C que de liaisons A-T (Galtier *et al.*, 1999).

8. Production des métabolites secondaires par les moisissures

Beaucoup de mycètes et de bactéries peuvent produire des composés appelés métabolites secondaires (Demain, 1999). Les métabolites secondaires se caractérisent par le fait que, leur production n'est pas indispensable à la croissance du microorganisme lui-même et ils sont de structure et d'activité biologique très diverses. Habituellement, ils sont sécrétés sous forme de mélange qui ne représente une structure chimique unique (Howksworth *et al.*, 1995 ; Boiron, 1996).

Les microorganismes ne produisent pas leurs métabolites secondaires avant d'avoir terminé leur phase de croissance et d'avoir entamé la phase stationnaire, appelé idiophase. En effet, le métabolite secondaire peut être un produit d'un métabolite primaire du même microbe (Calvot *et al.*, 2003 ; Tortora *et al.*, 2003) qui se forme (le métabolite primaire) au moment où les cellules se divisent durant la phase de croissance logarithmique appelée trophophase (Tortora *et al.*, 2003).

Les métabolites secondaires englobent tout produit à activités antibiotiques, pharmaceutiques, immunosuppressive et toxiques (mycotoxine et phytotoxine) (Jae-Hyuk and Keller,).

Chez les mycètes, la production de métabolites secondaires est un processus couplé au développement morphologique en particulier à la phase de sporulation (Hapwood, 1988 ; Mapleston *et al.*, 1992 ; Stone and Williams, 1992 ; Demain and fang, 2000 ; Calvo *et al.*, 2002).

8.1. Les mycotoxines

Les mycotoxines sont des métabolites secondaires peu volatiles, élaborés par diverses moisissures sous certaines conditions environnementales. A l'heure actuelle seules certaines espèces de moisissures sont connues comme ayant la capacité de produire des toxines. Leur biosynthèse est dépendante de plusieurs facteurs, dont la température, l'intensité lumineuse, le dioxyde de carbone dans l'air, les éléments nutritifs disponibles et la présence et la présence d'autres espèces en compétition (Hendey *et al.*, 1993).

Les mycotoxines se retrouvent dans le mycélium et les spores et peuvent diffuser dans le substratum. Plusieurs de ces toxines sont relativement stables et leur toxicité peut persister longtemps et ce même lorsque les cellules fongiques ne sont pas viables. Il faut toutefois noter qu'il n'existe actuellement pas de données sur la durée précise de cette toxicité. Il y aurait, selon les auteurs, jusqu'à 400 mycotoxines répertoriés (Etzel, 2002).

8.2. Les antibiotiques

Les antibiotiques sont des substances chimiques et /ou organiques produites par un petit nombre de microorganismes et exerçant une action toxiques envers d'autres microorganismes dont principalement les bactéries. Cette action peut être seulement inhibitrice de la croissance, elle est

alors bactériostatique et réversible, mais elle peut aussi être létale et dans ce cas elle est bactéricide et irréversible. Souvent un même antibiotique peut exercer l'un ou l'autre de ces effets, en fonction de sa concentration (Prescot, 1995).

Parmi un totale de quelque 10700 antibiotiques décrits pour l'ensemble du monde vivant, environ 1600 proviennent de champignon. La répartition des organismes producteurs dans les différentes classes ou ordres fongiques est fonction non seulement des capacités de synthèse mais aussi de la fréquence des diverses espèces dans la nature et de leur aptitude à se développer facilement en culture. Les genres *Aspergillus* et *Penicillium* ainsi que les espèces de l'ordre des Monilliales constituent les réservoirs les plus importants (Botton *et al.*, 1990).

Le mode d'action des ATB permet de tuer les bactéries sensibles (bactéricides) ou d'inhiber leurs développements (bactériostatiques).

Il existe des ATB à spectre étroite ou à large spectre, c'est-à-dire qui ciblent certaines bactéries précisément ou une large gamme d'espèces (Walsh, 2003; Plesiat, 2012).

8.3. Mécanismes d'action des substances antibactériennes

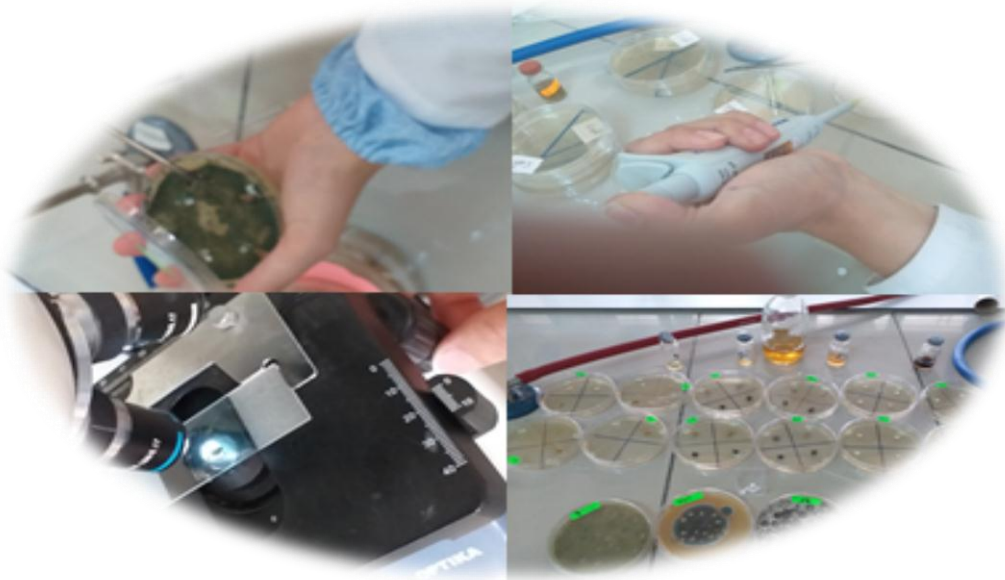
Les facteurs les plus importants de l'activité biologique dans composé donné sont ses propriétés physico-chimiques, sa structure chimique, arrangement stérique de ses atomes et la présence des parties bioactifs dans sa structure (Betina ,1989). Biochimiquement, les modes d'action des substances antimicrobiennes peuvent être divisés en quatre catégories (Riley and Norred, 1994) :

- ✓ L'interaction avec l'ADN.
- ✓ L'inhibition des différentes étapes de la synthèse de protéines ;
- ✓ Les effets sur les membranes cytoplasmiques ;
- ✓ L'effet sur le métabolisme énergétique.

Par ailleurs, ces différents modes d'action peuvent être étudiés par les méthodes suivantes (Betina, 1989) :

- ✓ Interaction avec des biomolécules (ADN ; au niveau moléculaire) ;
- ✓ Interaction avec des enzymes dans des réactions enzymatiques ;
- ✓ Interaction avec les cellules libérant les systèmes de défenses (effet sur ARN, synthèse d'ARN ou de protéine) ;
- ✓ Interaction avec des composants de la cellule (mitochondries ou membranes) ;
- ✓ Interaction au niveau cellulaire (culture cellulaire) ;
- ✓ Interaction au niveau des tissus et des organes après l'administration a un organisme vivant.

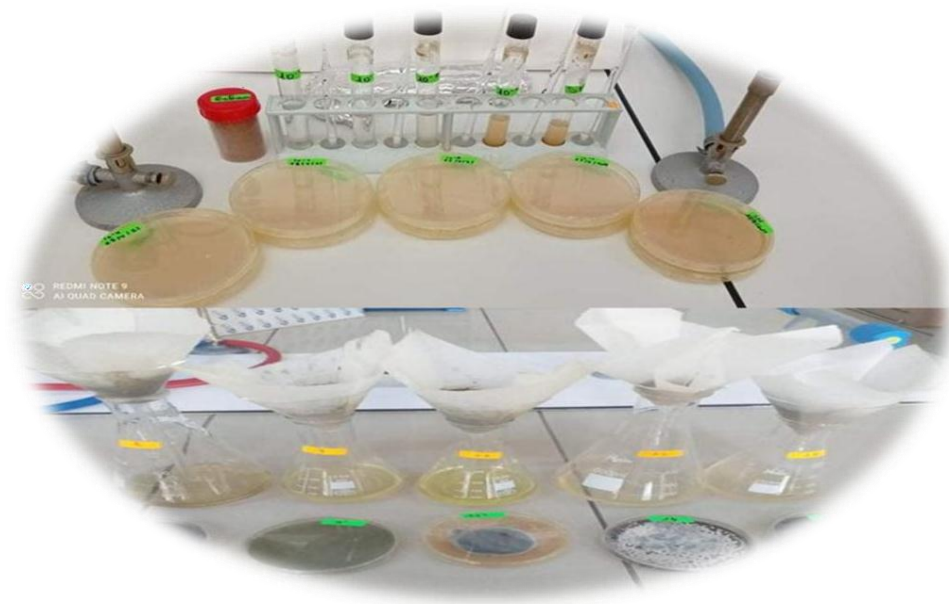
Partie Pratique



Matériel

et

Méthodes



Ce travail est réalisé au niveau de Laboratoire de biologie centre universitaire Abdelhafid Boussouf Mila .Il porte sur l'isolement et l'identification des moisissures isolées du sol, ainsi que l'étude de leur activité antibactérienne. En effet, les échantillons du sol utilisés ont été prélevés du site hammam Yahia Beni Guecha.

1. Le site d'étude

Le site d'étude est une source thermale Hammam Yahia Beni Guecha (Mila). La wilaya de Mila, compte une dizaine de sources thermales traditionnelles, dont les eaux tièdes réputées pour diverses vertus thérapeutiques attirent en été de nombreux curistes. Hammam Béni Guecha est l'un de ces thermes dont la tradition se perd dans les époques les plus lointaines, des amateurs de sources thermales qui perpétuent à la fois, un art de vivre et une médecine thermale connue au moins depuis les romains.

Le 22/04/2021, les échantillons ont été prélevés à partir des sols environnants de stations de Source thermophiles (situées dans Nord Est de l'Algérie, et dans le West de la wilaya de Mila, il est situé sur la route reliant Mila à Ferdjioua), Yahia Beni Guecha commune, daïra de Ferdjioua (Hammam Beni Guecha).

2. Isolement des champignons du sol

2.1. Échantillonnage

20g, environ, de sol ont été prélevés à l'aide d'une cuillère stérile de 10 ml à cette station en tenant compte de la végétation. L'échantillon est déposé sur un papier d'aluminium stérile soigneusement enveloppé dans un sac en papier stérile. Il a été ensuite gardé au frais (2°C) puis transféré au laboratoire pour une analyse immédiate.

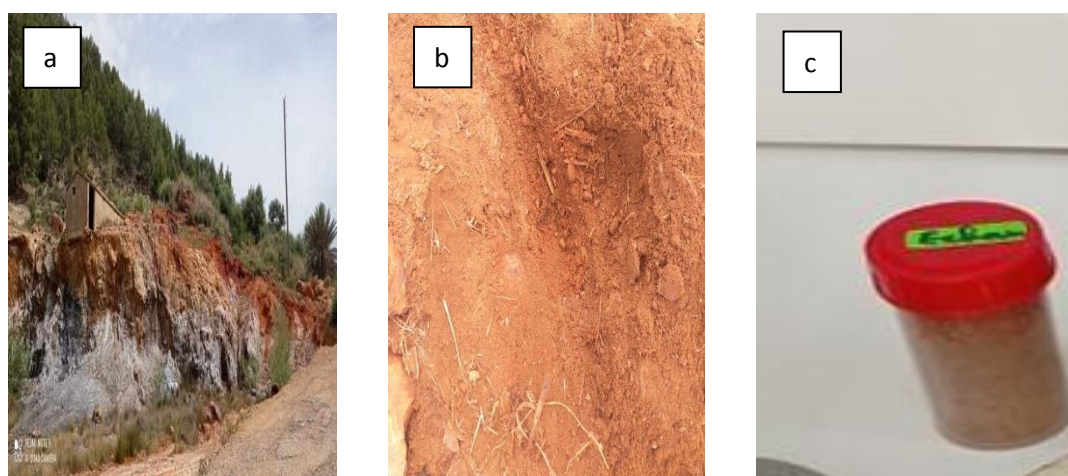


Figure 03: Le site de prélèvement à hammam Yahia Beni Guecha

(a : hammam Yahia Beni Guecha ; b : site de prélèvement ; c : Echantillon de sol)

2.2. Préparation de la solution mère

Une quantité de 1g de sol a été dilué dans 9ml d'eau physiologique stérile, puis le mélange a été agité au Vortex.

2.3. Milieu de culture des moisissures

Le milieu utilisé pour l'isolement des moisissures du sol est la gélose PDA (potato dextrose agar) (voir annexe 01). La croissance bactérienne est inhibée par l'addition de (Amoclane (amoxiciline/acide clavolanic 1g/125mg)) au milieu de culture, avant stérilisation, à la concentration de 5 mg/l (Botton *et al*, 1999).

2.4. Préparation des dilutions

➤ But

La diminution de la charge microbienne par dilution de l'échantillon de sol à analyser est réalisée dans le but d'une purification ultérieure plus aisée et l'obtention de colonies bien séparées à partir des cultures mixtes.

➤ Principe

La dilution consiste à diminuer la densité de sol en micro-organismes, d'abord à 1/10 puis à 1/100 et ainsi de suite jusqu'à réduire la concentration microbienne de la suspension mère au facteur de 10^{-4} . (Figure 4). Ainsi, le sol est prêt à l'analyse microbiologique, bien que la probabilité d'éliminer un nombre considérable d'espèces microbiennes soit non nulle.

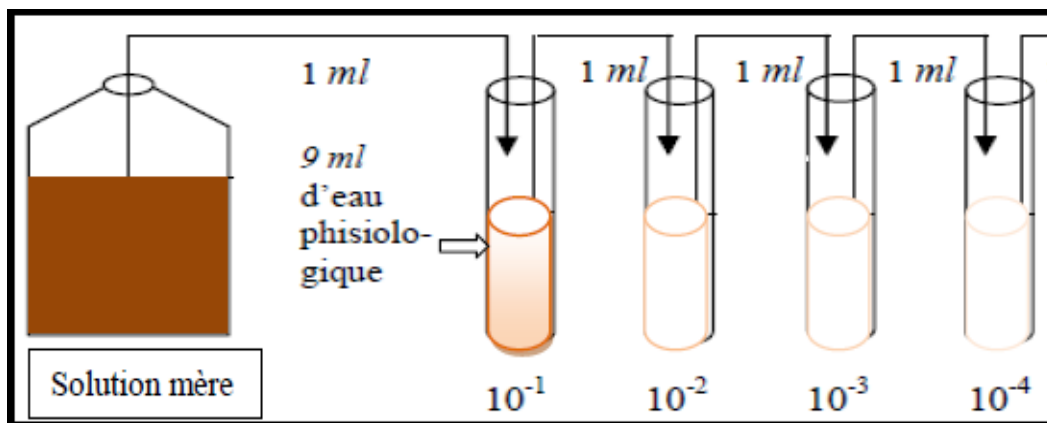


Figure 04 : Préparation des dilutions

2.5. Méthode d'isolement

Avant d'entamer le travail, il est important de créer une zone stérile, par la flamme du bec Bunsen, sur une paillasse soigneusement nettoyée. Les étapes suivantes sont :

- ✓ Procéder tout d'abord à la numérotation des tubes en les étiquetant respectivement de 10^{-1} à 10^{-4} cellules/ml pour les différentes dilutions.

- ✓ prélever à l'aide d'une pipette graduée, 1ml d'échantillon mère, puis l'ajouter à 9ml d'eau physiologique stérile dans un tube à essai, permettant ainsi d'obtenir une suspension microbienne diluée à 10^{-1} par rapport à la suspension mère.
- ✓ Prélever 1 ml de la suspension 10^{-1} agitée, à l'avance à l'aide d'un vortex, avec une pipette pasteur neuve et diluer dans un second tube à essai contenant 9ml d'eau physiologique stérile, pour arriver à une dilution de 10^{-2} ; et ainsi de suite, à chaque dilution, pour arriver à diminuer la charge microbienne de l'échantillon mère à l'exponentiel de 10^{-4} . Changer les pipettes entre chaque prélèvement.

2.6. Ensemencement des moisissures

Tout en respectant les conditions d'asepsie et en manipulant toujours dans la zone stérile, Le milieu de culture PDA a été coulé en boîte de Pétri.

- ✓ Après solidification chacune des boîtes de Pétri ont été ensemencées avec 1 ml de chaque dilution.
- ✓ Etaler à l'aide d'un râteau, sur toute la surface de la boîte de Pétri coulée (Le râteau en verre est flambé avant et après chaque utilisation).
- ✓ Chaque dilution est déposée sur deux boîtes de pétri et homogénéisée avec le milieu PDA (Annexe 01).
- ✓ Sur les boîtes ensemencées on indique le numéro de l'échantillon, la dilution ainsi que la date d'ensemencement.
- ✓ Les boîtes sont incubées à 28°C et sont observées quotidiennement trois à sept jours.



Figure 05: Ensemencement des moisissures

2.7. Repiquage et purification des moisissures

Après un bon développement des colonies, nous avons effectué des repiquages de chaque colonie pour purifier les champignons et minimiser les risques de contamination, jusqu'à arriver à isoler sur chaque boîte de Pétri une seule colonie d'un champignon donné. (Guiraud, 1998).

Le repiquage se fait par prélèvement d'un fragment de colonie à l'aide d'une anse stérilisée tout en évitant son contact avec les autres colonies avoisinantes de la même boîte sur milieu PDA.

Ce fragment est déposé au centre d'une nouvelle boîte de même milieu PDA sur laquelle on indique la date de repiquage et les coordonnées de la boîte de prélèvement.

Le repiquage se fait aseptiquement près du bec Bunsen. Les boîtes sont incubées à 28°C pendant six jours jusqu'à obtention des souches pures.

Des repiquages successifs des souches jusqu'à l'obtention des souches pures.

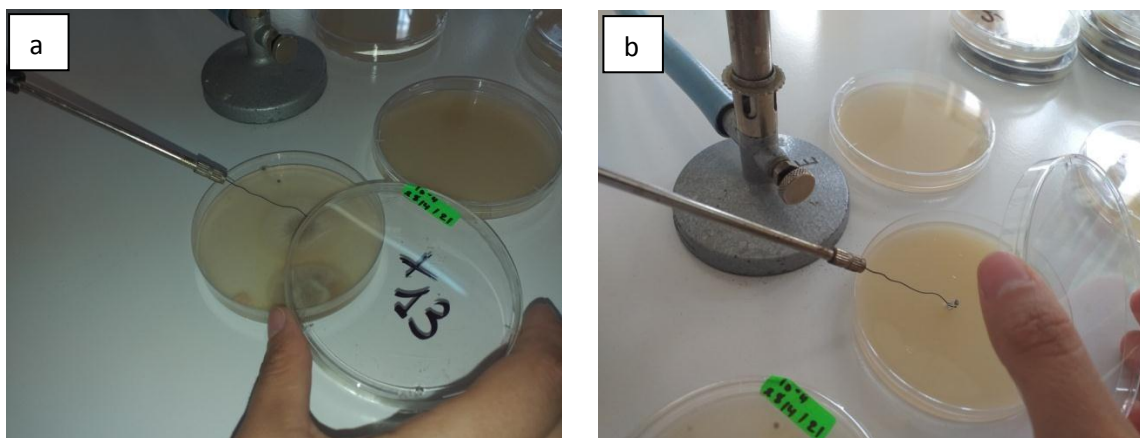


Figure 06: Purification des moisissures

3. Identification des souches fongiques

L'identification d'une souche représentative est effectuée par deux techniques classiques : une observation macroscopique et une étude microscopique des souches, largement suffisantes pour déterminer le genre des moisissures isolées et cela en réalisant des ensemencements par touches sur des milieux d'études solides favorisant la croissance et la sporulation des moisissures (on a utilisé milieu PDA).

3.1. Identification macroscopique

L'identification des souches obtenues est déterminée après leur ensemencement sur le milieu de culture spécifique (PDA). L'identification se fait à l'œil nu, elle se base essentiellement sur les caractères suivants: la vitesse de croissance, l'aspect du mycélium aérien, couleur de l'envers de la colonie, l'odeur et la couleur des moisissures.

3.2. Identification microscopique

L'identification microscopique des champignons repose sur plusieurs méthodes, les deux les plus utilisées sont celles la méthode de coloration par bleu de méthylène et la méthode de Scotche.

Ces deux méthodes sont décrites ci- dessous :

- La coloration par bleu de méthylène : un fragment de la colonie est prélevé à l'aide d'une anse de platine et déposé sur une lame porte-objet dans une goutte de colorant, ensuite recouvrir avec une lamelle couvre – objet qui écrase la préparation.
- Méthode de scotche : Elle consiste à adhérer à l'aide d'un bout de scotch (technique du drapeau) une fraction mycélienne on le recolle sur une lame préalablement étalée par une goutte de bleu de méthylène diluée avec deux goutte de l'eau physiologique.
- L'observation microscopique est effectuée en microscope optique aux différents grossissements (GX10, GX40) ainsi qu'à l'immersion.

4. La fermentation des souches obtenues

Le milieu de fermentation utilisé pour cet objectif est le PDB (Potatoes dextrose broth) (annexe1). Des flacons de 250 ml, contenant 100ml du milieu de culture, ont été inoculés par quatre disques de culture âgée de sept jours pour chaque souche, et incubées à 28°C pendant 14 jours.

Après la fermentation, les contenus des flacons de fermentation ont été filtrés à travers du papier filtre, afin de prendre le filtrat du milieu de culture supposant contenir les molécules bioactives.

Pour une bonne extraction des filtrats nous avons (Figure 7):

- Ajouter le même volume obtenu de filtrat du solvant dichlorométhane sur chaque filtrat
- Mettre les solutions dans des ampoules à décanter, laisser 30mn.
- Séparer la phase organique de la phase aqueuse dans chaque solution.
- Mettre les extraits obtenus dans le rotavapeur pour prendre des extraits bruts qui contiennent les métabolites secondaires.
- Ajouter 2ml de chloroforme sur chaque extrait.
- Mettre dans des flacons stériles dans le réfrigérateur jusqu'à leur utilisation dans l'étude de l'activité antibactérienne.

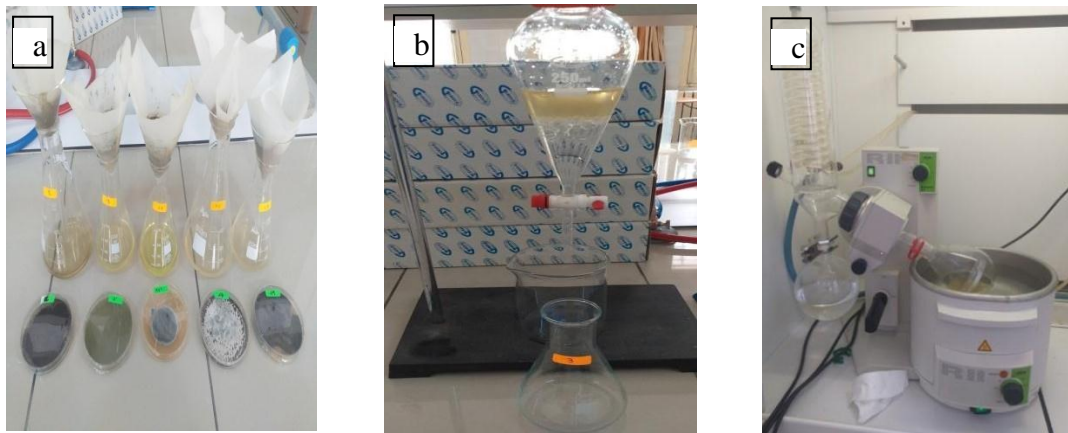


Figure 07: Préparation de l'extrait des souches fongique

(a : filtration ; b : décantation ; c : extraction)

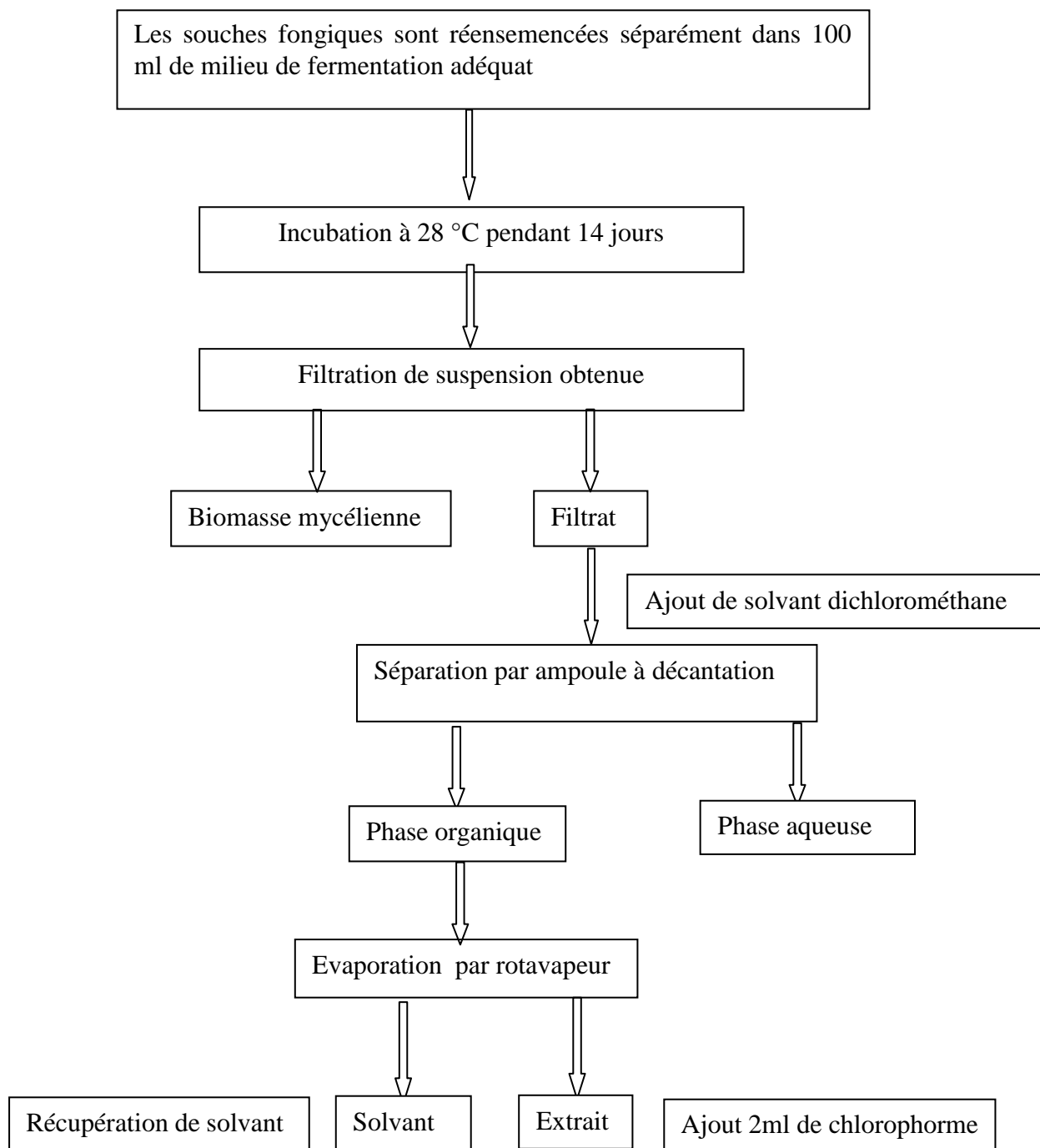


Figure 08 : Extraction des métabolites secondaires fongiques bruts

5. Mise en évidence de l'activité antibactérienne des souches obtenues

La mise en évidence de l'activité antibactérienne des souches fongiques étudiées est déterminée en mesurant le diamètre de la zone d'inhibition. Pour évaluer cette activité, trois techniques ont été choisies : technique des cylindres d'agar (contacte directe entre le champignon et la bactérie), technique des disques et technique des puits (en testant le filtrat brute de la fermentation).

5.1. Préparation des bactéries tests

5.1.1. Bactéries tests

L'activité antibactérienne, de plusieurs genres de moisissures, a été testée vis-à-vis de quatre bactéries *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *pseudomona aeruginosa*, *staphylococcus aureus*. (Annexe 2)

Le tableau suivant résume le gram et le code et l'origine des bactéries :

Tableau 01 : Les bactéries tests

Bactéries	Gram	Code	Origine
<i>Escherichia coli</i>	Négatif	ATCC11303	Laboratoire Ghaouat d'Ain Mlila, Oum El Bouaghi
<i>Bacillus cereus</i>	Positif	ATCC10987	Laboratoire Ghaouat d'Ain Mlila, Oum El Bouaghi
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	Négatif	ATCC27853	Laboratoire Ghaouat d'Ain Mlila, Oum El Bouaghi
<i>Staphylococcus aureus</i>	Positif	ATCC25923	Laboratoire Ghaouat d'Ain Mlila, Oum El Bouaghi

5.1.2. Réactivation de bactéries tests

Les souches sélectionnées ont été revivifiées dans des boites de pétries coller par la gélose nutritive (annexe 1), et incubées à 37°C pendant 24 heures. Puis elles ont revivifiées des tubes contenant 9 ml de bouillon nutritif (annexe 1) et incubées à 37°C pendant 24 heures avant d'être testées, des cultures bactériennes jeunes sont obtenues. Après l'incubation des souches, on a raclé à l'aide d'une pipette Pasteur quelques colonies bien isolées et parfaitement identiques, puis on a déchargé la pipette dans 9 ml de l'eau physiologiques stériles (annexe 1), Les suspensions bactériennes doivent être bien homogénéisées.

A l'aide d'un écouvillon stérile trempé dans les suspensions bactérienne, on ensemence uniformément toute la surface des boites contenant le milieu Muller -Hinton (annexe 6).

5.2. Les tests de l'activité anti bactérienne

5.2.1. Technique des cylindres d'agar

A l'aide des pipettes pasteurs et une anse de platine, on dépose sur des à la surface du milieu Mueller-Hinton préalablement ensemencés par écouvillonnage par les bactéries tests ; des disques de 5 mm de diamètre d'une colonie mycélienne de 6 à 7 jours, cultivées sur PDA, Après séchage les boites de Pétri sont incubées à 37°C pendant 24h. Les diamètres des zones d'inhibition sont ensuite mesurés au millimètre près.

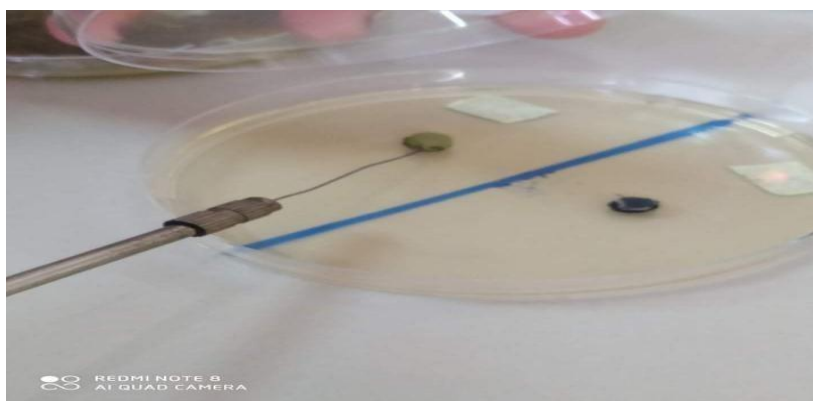


Figure 09: Test de l'activité antibactérienne par technique de cylindre agar

5.2.2. Technique des disques

Le test de l'activité antibactérienne des extraits obtenus consiste à rechercher leurs effets antagonistes sur le développement des espèces bactériennes. Un écouvillon stérile trempé dans la suspension bactérienne a servi à ensemencer uniformément toute la surface de la boîte de gélose Mueller - Hinton. Après séchage de la surface (environ 5 min), des disques de 5 mm de diamètre du papier Wattman imbibés avec 10µl de l'extrait à tester, sont séchés et déposés sur la surface des boites. Ces dernières, sont incubées dans une étuve à 37°C pendant 18 à 24 heures.

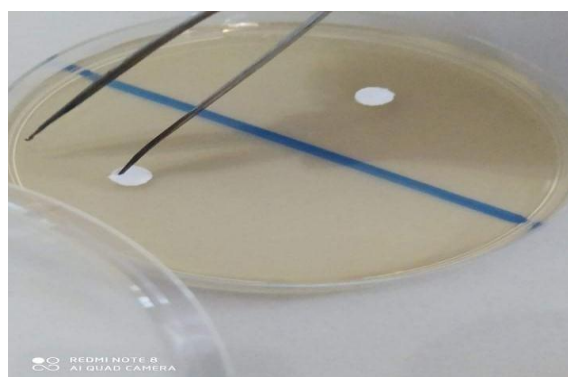


Figure 10: Test de l'activité antibactérienne par technique de disque

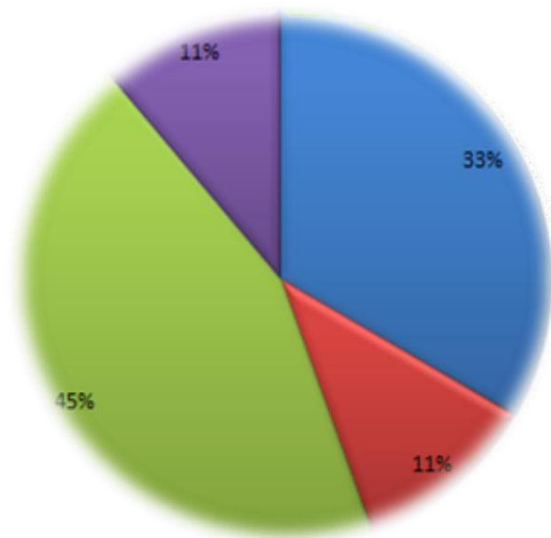
5.2.3. Technique des puits

Des boîtes de pétri contenant une couche de gélose Mueller-Hinton, sont préparées avec les bactéries tests. Après un séchage de 5 min, on creuse des puits de 5mm à l'aide d'un emporte-pièce. Puis couvrir la surface des puits par la gélose Mueller-Hinton, Les puits préparés sont prêts pour recevoir un volume de 10µl du filtrat. Les boîtes sont ensuite laissées à température ambiante pendant 30 minutes, puis incubées à 37 °C pendant 18 à 24h.



Figure 11: Test de l'activité antibactérienne par technique de puits

Résultats
Et
Discussion



Ce travail consiste à isoler, purifier, identifier et déterminer l'activité antibactérienne des souches fongiques prélevées à partir d'une source thermale.

1. Isolement des champignons du sol

Les cultures réalisées à partir des dilutions décimales d'échantillon de sol thermal appartiennent à hammam Yahia Beni Guecha. Ils ont abouti à des aspects, de texture et de couleurs différentes sur milieu PDA. Nous avons pu sélectionner 09 souches fongiques que nous avons purifiées.




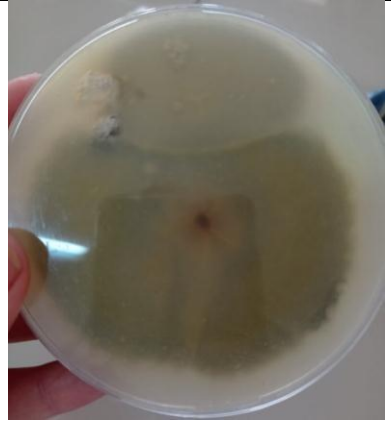


2. Identification des souches






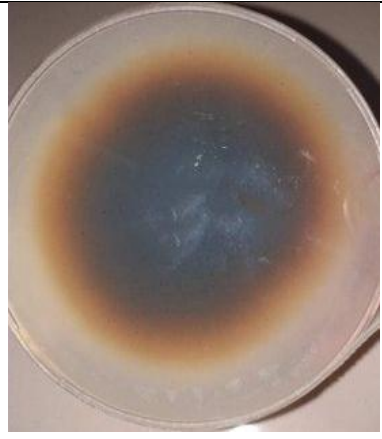
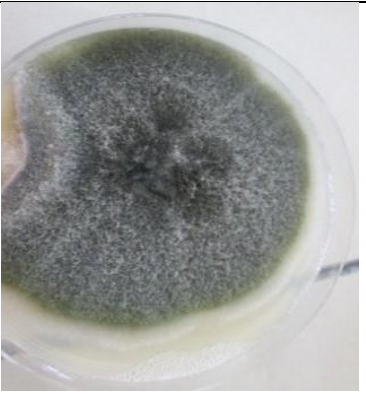

L'identification de ces genres étant basée essentiellement sur les clés de détermination décrites par la littérature (Botton *et al*, 1990 ; Guiraud, 1998), en se basant sur les caractères macroscopiques des colonies (aspect, couleur, forme, contour...etc.) et sur les caractères microscopiques du mycélium et des conidies ou spores (cloisonnement du mycélium, forme des spores, forme des organes de fructification...etc).





2.1. Etude macroscopique

Les caractères macroscopiques des différentes souches sont étudiés sur le milieu PDA, Le tableau suivant résume l'aspect du mycélium des souches isolées, la consistance des colonies, la couleur du revers de la boîte ainsi que la présence ou l'absence de pigments caractéristiques de chaque souche.

Tableau 02 : Etude Macroscopique des souches fongiques isolées à partir du sol

Espèce	Description	Aspect Macroscopique	
		Face	Revers
<i>Aspergillus Niger</i>	<p>Couleur : noire</p> <p>Aspect : poudreuse irrégulière</p> <p>Revers : pas de pigment</p> <p>Beige clair</p>		
<i>Aspergillus niger</i>	<p>Couleur : noire</p> <p>Aspect : Granuleuse à Poudreuse</p> <p>Revers : pas des pigments</p> <p>Beige clair</p>		
<i>Aspergillus flavus</i>	<p>Couleur : Verte</p> <p>Aspect : Floconneux</p> <p>Revers : pas des pigments</p> <p>Beige clair</p>		

<p><i>Alternaria</i> <i>sp 1</i></p>	<p>Couleur : Blanche Aspect : Velouté Revers : noir</p>		
<p><i>Alternaria</i> <i>sp 2</i></p>	<p>Couleur : Blanche Aspect : Velouté Revers : Marron foncé</p>		
<p><i>Alternaria</i> <i>sp 3</i></p>	<p>Couleur : Blanche Aspect : Velouté Revers : Noir virant au marron foncé</p>		
<p><i>Alternaria</i> <i>Alternata</i></p>	<p>Couleur : noire ou vert olive Aspect : Floconneuse Revers : Noir</p>		

<p><i>Aureobasidium</i> <i>m sp</i></p>	<p>Couleur : vert à noirâtre tourné par un cercle orange Aspect : Velouté</p> <p>Revers : marron foncé</p>		
<p><i>Penicillium</i> <i>sp</i></p>	<p>Couleur : vert tourné par un cercle blanc Aspect : veloutée à poudreuse</p> <p>Revers : pas de pigment Beige claire</p>		

2.2. Etude microscopique

L'étude microscopique porte sur l'observation des structures caractéristiques des 09 souches fongiques (Conidiophores, conidies et mycélium). (Tableau 03).

L'isolement à partir du sol thermal du hammam yahia beni guecha a permis l'obtention de 09 isolats fongiques appartenant à 4 genres : *Aspergillus*, *Alternaria*, *Penicillium* et *Aureobasidium*.

➤ 4 souches présentent les caractéristiques suivantes :

- ✓ Des spores grandes, colorées brunâtres et compartimentées par des septa (cloisons) transversaux.
- ✓ Les conidiophores sont bruns, septés et ont souvent l'aspect de « zigzags ». Ils portent des conidies simples ou ramifiées.

Ces souches semblent appartenir au genre *Alternaria*

➤ 3 souches présentent les caractéristiques suivantes :

- ✓ Des conidies produites par des phiales insérées à l'extrémité dilatée d'un conidiophore large et non cloisonné (disposition en tête aspergillaire).

- ✓ colonies souvent poudreuses ou granuleuses.

Ces souches semblent appartenir au genre *Aspergillus*.

➤ **1 souche caractérisée par :**

- ✓ Des conidies produites par des phialides groupées en verticilles à l'extrémité non dilatée d'un conidiophore fin et cloisonné (disposition en pinceau).
- ✓ Des phialides à col peu développées disposés en pinceaux serrés.

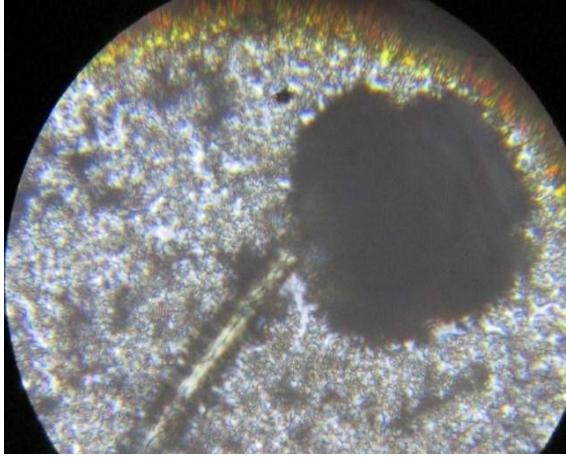

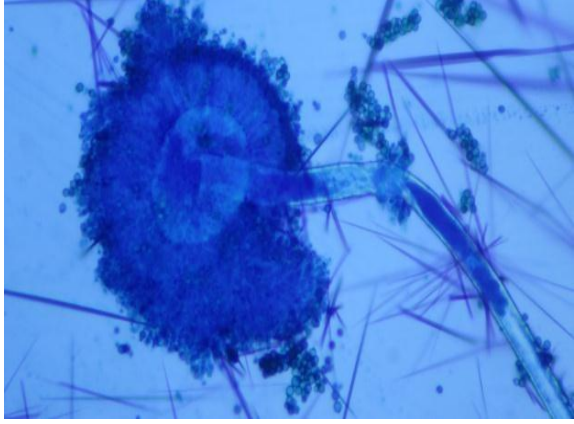
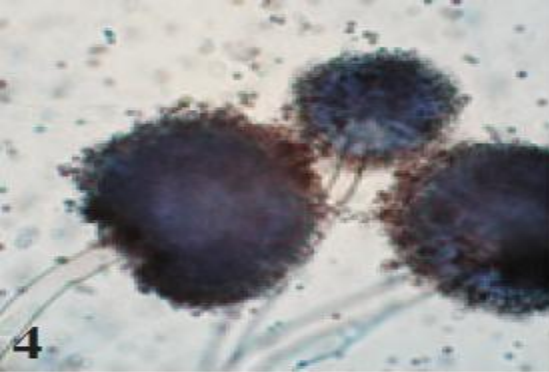
Ces souches appartiennent probablement au genre *Penicillium sp.*

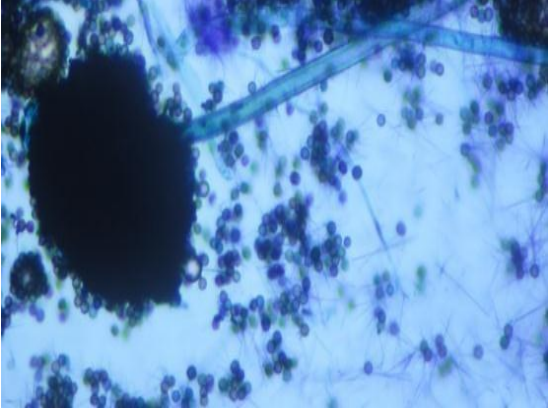
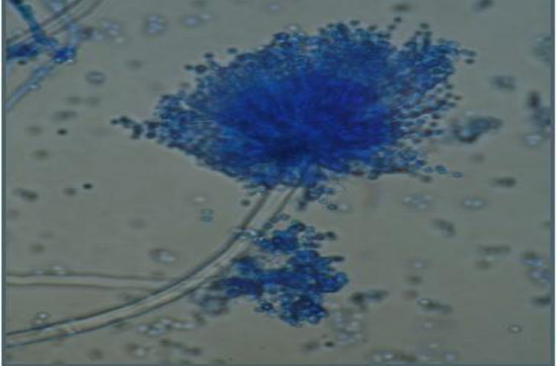
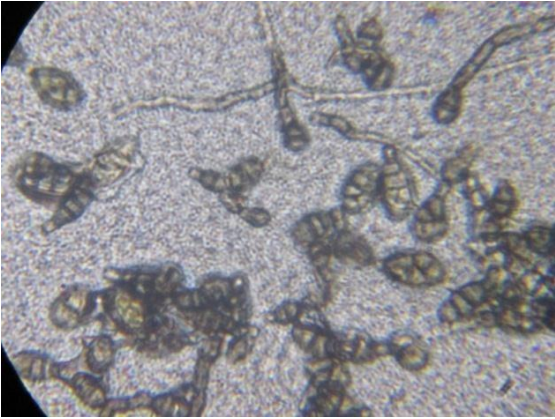
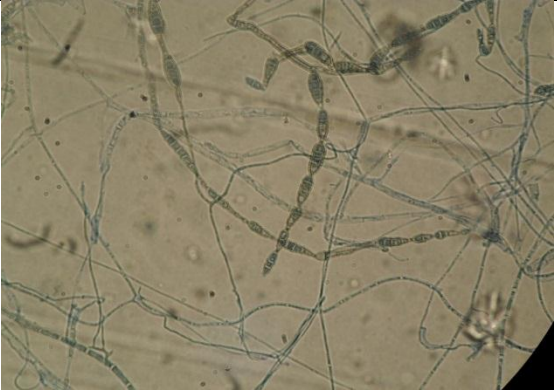


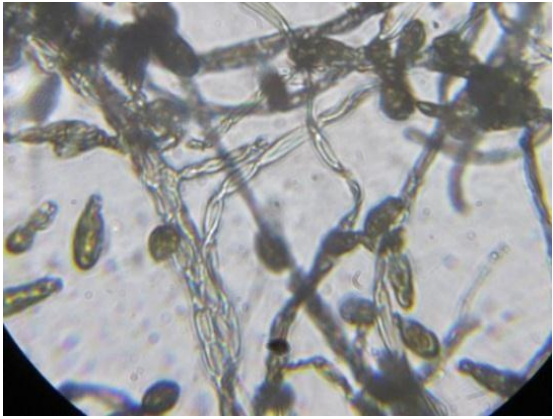
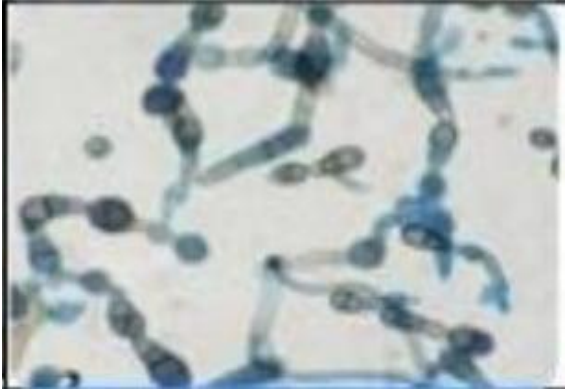
➤ **1 souche caractérisée par :**

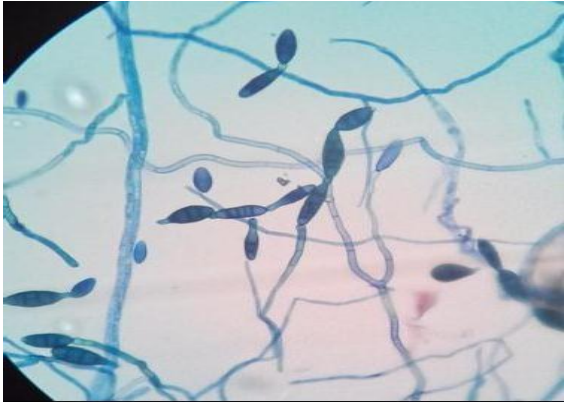
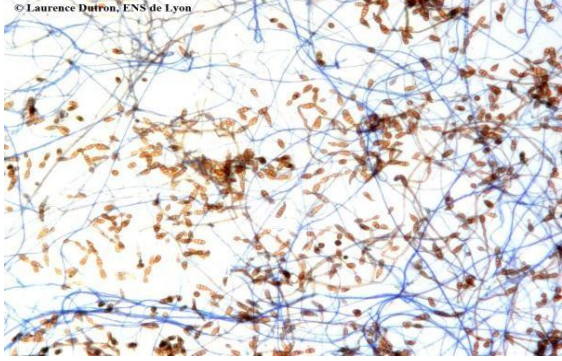
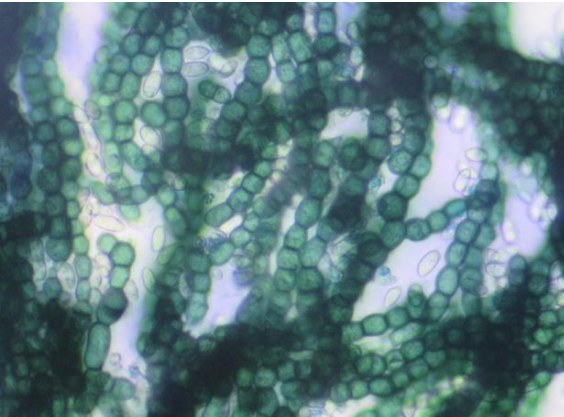

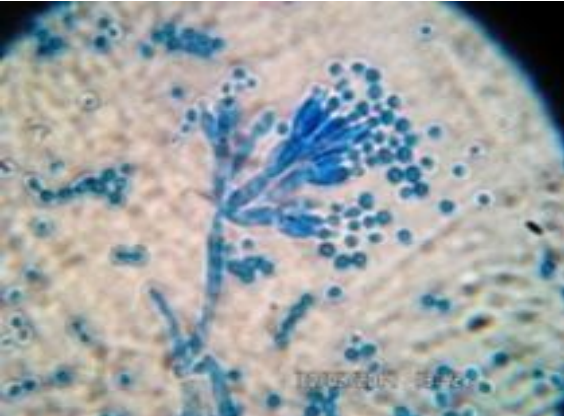
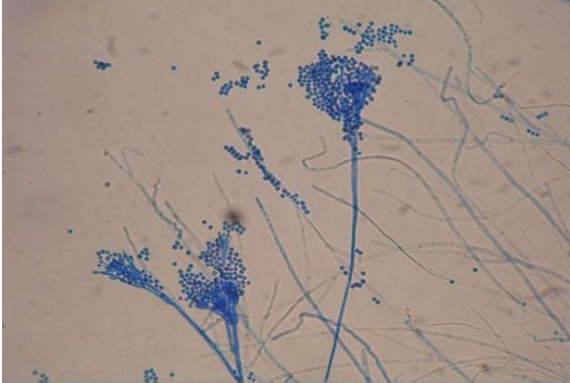
- ✓ Colonies filamenteuses.
- ✓ Couleur de colonies généralement vert.
- ✓ Hyphe septé.
- ✓ Conidies unicellulaires.

Ces souches appartiennent probablement au genre *Aureobasidium*.

Tableau 03 : Etude Microscopique des souches fongiques isolées à partir du sol

Espèce	Aspect microscopique	Photo de référence
<i>Aspergillus niger</i>		 (Pitt, 1973)
<i>Aspergillus niger</i>		 (Chabasse, 2002)

<p><i>Aspergillus flavus</i></p>		 <p>(Arfaoui, 2019)</p>
<p><i>Alternaria sp 1</i></p>		 <p>(https://www.gbif.org/occurrence/2270823254)</p>
<p><i>Alternaria sp 2</i></p>		 <p>(Zerigui f, Mouzaoui f, 2018)</p>
<p><i>Alternaria sp 3</i></p>		 <p>(Hamid sonia,2015)</p>

<p><i>Alternaria alternata</i></p>	 Microscopic view of <i>Alternaria alternata</i> showing long, thin, branched hyphae with several dark, oval-shaped spores attached to the ends of the branches.	<p>© Laurence Dutron, ENS de Lyon</p>  Microscopic view of <i>Alternaria alternata</i> showing a dense network of thin, blue-stained hyphae with numerous small, brown, oval-shaped spores scattered throughout.	<p>(Laurence Dutron, 2012)</p>
<p><i>Aureobasidium sp</i></p>	 Microscopic view of <i>Aureobasidium sp.</i> showing thick, green, multi-segmented hyphae with a distinct, darker outer layer.	 Microscopic view of <i>Aureobasidium sp.</i> showing thick, green, multi-segmented hyphae with a distinct, darker outer layer.	<p>www.mold-help.org/aureobasidium-pullulans/</p>
<p><i>Penicillium sp</i></p>	 Microscopic view of <i>Penicillium sp.</i> showing a branched structure with numerous small, blue, oval-shaped spores clustered at the ends of the branches.	 Microscopic view of <i>Penicillium sp.</i> showing a branched structure with numerous small, blue, oval-shaped spores clustered at the ends of the branches.	<p>(Arfaoui, 2019)</p>

L'analyse des résultats montre par ordre croissant, que le genre majoritaire est *Alternaria sp* avec une fréquence de 45%, suivie du genre *Aspergillus sp* avec un pourcentage de 33 %, enfin les genres *Penicillium sp* et *Aureobasidium* avec un même pourcentage de 11 %. (Figure 12)

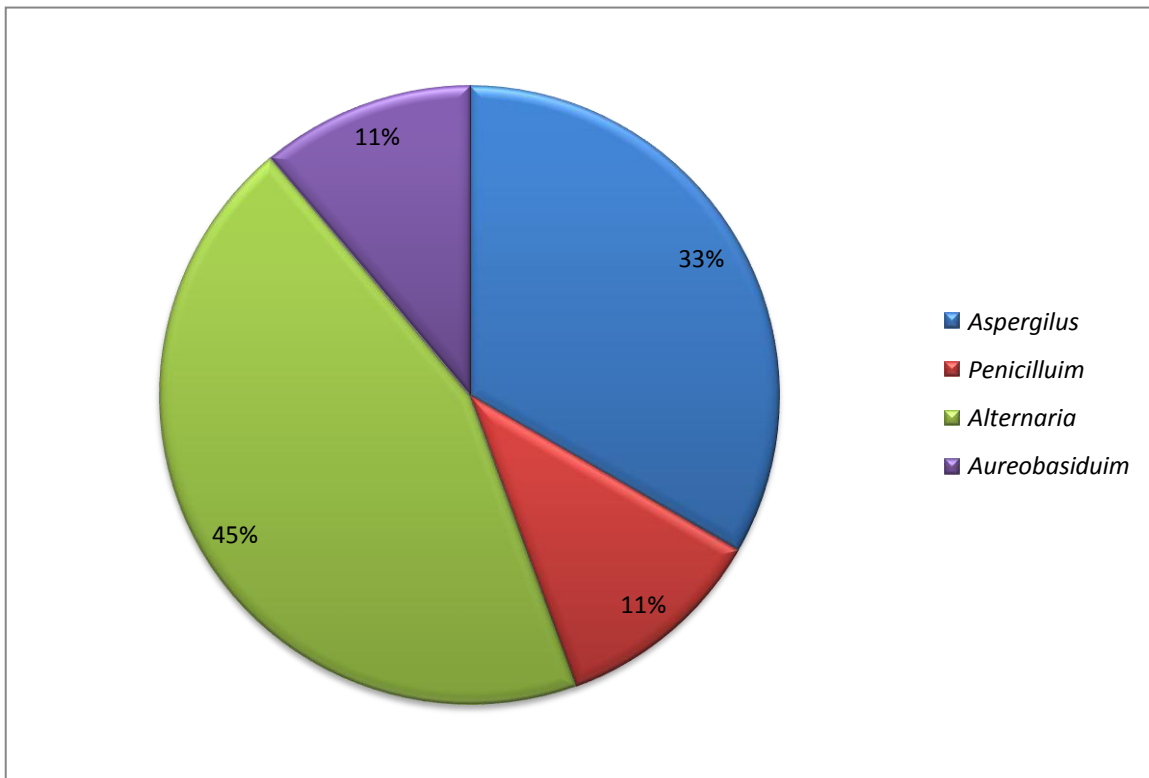


Figure 12: Pourcentage des genres fongiques isolés du sol de hammame Beni Guecha.

Nos résultats sont en accord avec Alvarez-Rodriguez *et al.* 2003 ; Boiron, 1996, qui ont déclaré qu'*Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria*, *Fusarium*, *Trichoderma*, *Mucor*, *Absidia*, *Rhizopus* sont des souches autochtones, habituellement isolées à partir de la plupart des terrains. (Ruark *et al.*, 1992 ; Madigan *et al.*, 1997 ; Subleret *et al.*, 1998 ; Peuk, 2000 ; Smith *et al.*, 2000).

3. Etude de l'activité antibactérienne

L'activité antibactérienne des moisissures a été largement décrite *in vitro* dans plusieurs études. Dans cette étude nous avons testé l'activité antibactérienne d'un total de 4/9 espèces deux souches appartenant aux genres d'*Aspergillus*, *Penicillium* respectivement, et deux souches du genre *Alternaria* : *Alternaria Alternata* et *Alternaria sp* , avec quatre bactéries test : *E.coli* Gram négatif, *Bacillus cereus* Gram positif, *Pseudomonas aeruginosa* Gram négatif et *Staphylococcus aureus* Gram positif.

Pour cela trois techniques ont été utilisées : la technique des cylindres d'agar, la technique des disques et la technique des puits.

Les isolats ont développé une activité antibactérienne au moins sur une des bactéries tests. En effet une zone de lyse de taille différente autour des disques déposés a été mise en évidence (Figure 13). La lecture des résultats a été faite par la mesure des diamètres de la zone d'inhibition autour de chaque disque à l'aide d'un pied à coulisse (mm).

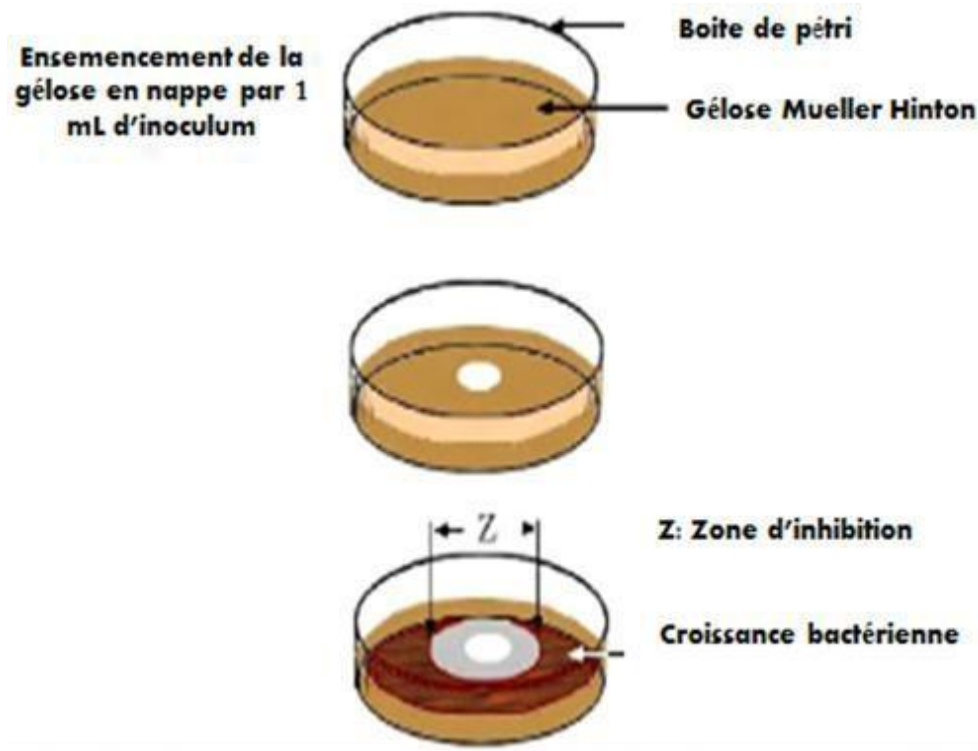


Figure 13 : Résultats attendus après réalisation des tests par technique du disque

L'activité antibactérienne contre les bactéries pathogènes à l'homme a été évaluée en observant la zone d'inhibition de la croissance d'espèces testées en contact de nos moisissures.

3.1. Technique des cylindres d'agar

L'apparition d'une zone translucide autour des cylindres d'agar permet, après incubation de 24h, de déceler la présence des métabolites secondaires qui inhibent la croissance des bactéries tests.

Pour cette technique, les résultats montrent que les quatre espèces fongiques d'*Aspergillus flavus*, *Penicillium sp*, *Alternaria sp* et *Alternaria Alternata* présentent une activité antibactérienne considérable contre les bactéries *P. aeruginosa*, *S. aureus*, mais avec la bactérie *B. cereus* les souches d'*Aspergillus flavus*, *Penicillium sp*, *Alternaria sp* présentent une activité antibactérienne

(Figure 14), où les moyennes des diamètres des zones d'inhibition allaient de 6 mm à 9 mm. Contrairement avec *E.coli* toutes les espèces fongiques n'ont eu aucun effet sauf la souche fongique *A. flavus* présente une activité antibactérienne.

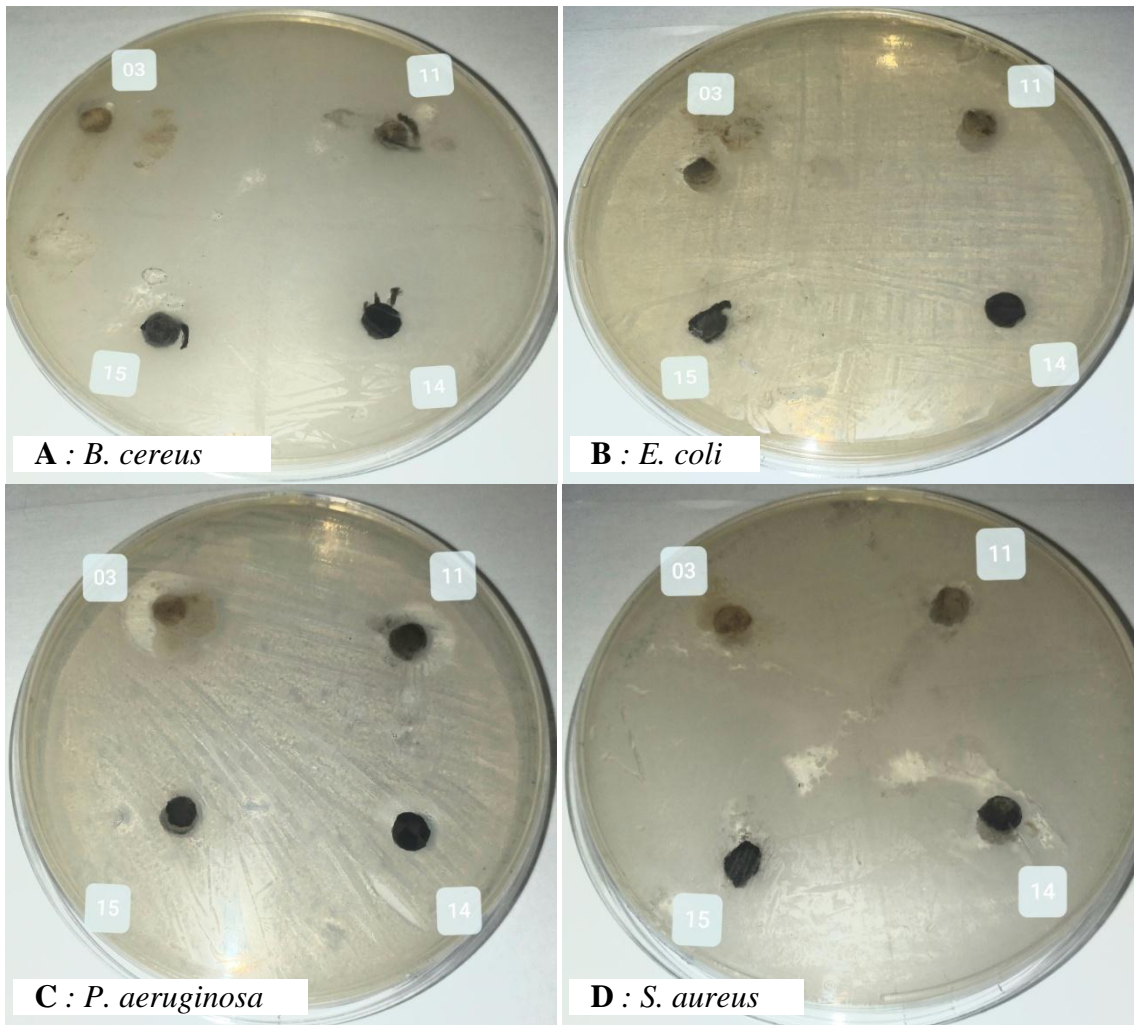


Figure 14 : Activité antibactérienne des quatre souches fongiques par la technique des cylindres d'agar avec les bactéries : **(A)** *Bacillus cereus* ; **(B)** *Escherichia coli*; **(C)** *Pseudomonas aeruginosa*; **(D)** *Staphylococcus aureus*.

L'activité antibactérienne des quatre souches fongiques par la technique des cylindres d'agar avec les bactéries *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus* présente par la création de la zone d'inhibition.

Le tableau suivant résume les résultats obtenus :

Tableau 04 : L'activité antibactérienne par technique de cylindre agar des isolats, vis-à-vis des quatre bactéries test.

Les souches fongiques	L'activité antibactérienne de l'isolat, vis-à-vis des quatre bactéries Test			
	<i>E. coli</i>	<i>B. cereus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>
<i>A. Flavus</i>	+	+	+++	++
<i>Penicillium sp</i>	-	+	++	++
<i>Alternaria sp</i>	-	-	++	+++
<i>Alternaria alternata</i>	-	+	-	+

➤ La souche *A. flavus*

Les résultats suivants montrent que la variation de la zone d'inhibition entre la souche *Aspergillus. flavus* et les différentes bactéries tests *Escherichia coli* Gram négatif, *Bacillus cereus* Gram positif, *Pseudomonas aeruginosa* Gram négatif et *Staphylococcus aureus* Gram positif.

Les résultats suivants montrent que :

- La souche *Aspergillus flavus* présente une bonne activité avec la bactérie *P. aeruginosa* et elle a créé une zone d'inhibition de diamètre de 17 mm.
- La souche *Aspergillus flavus* présente une activité considérable avec la bactérie *S. aureus* et elle a créé une zone d'inhibition de diamètre de 14 mm.
- La souche *Aspergillus flavus* présente une activité connue avec la bactérie *E. coli* et elle a créé une zone d'inhibition de diamètre de 8 mm.
- La souche *Aspergillus flavus* présente une activité connue avec la bactérie *B. cereus* et elle a créé une zone d'inhibition de diamètre de 7 mm.

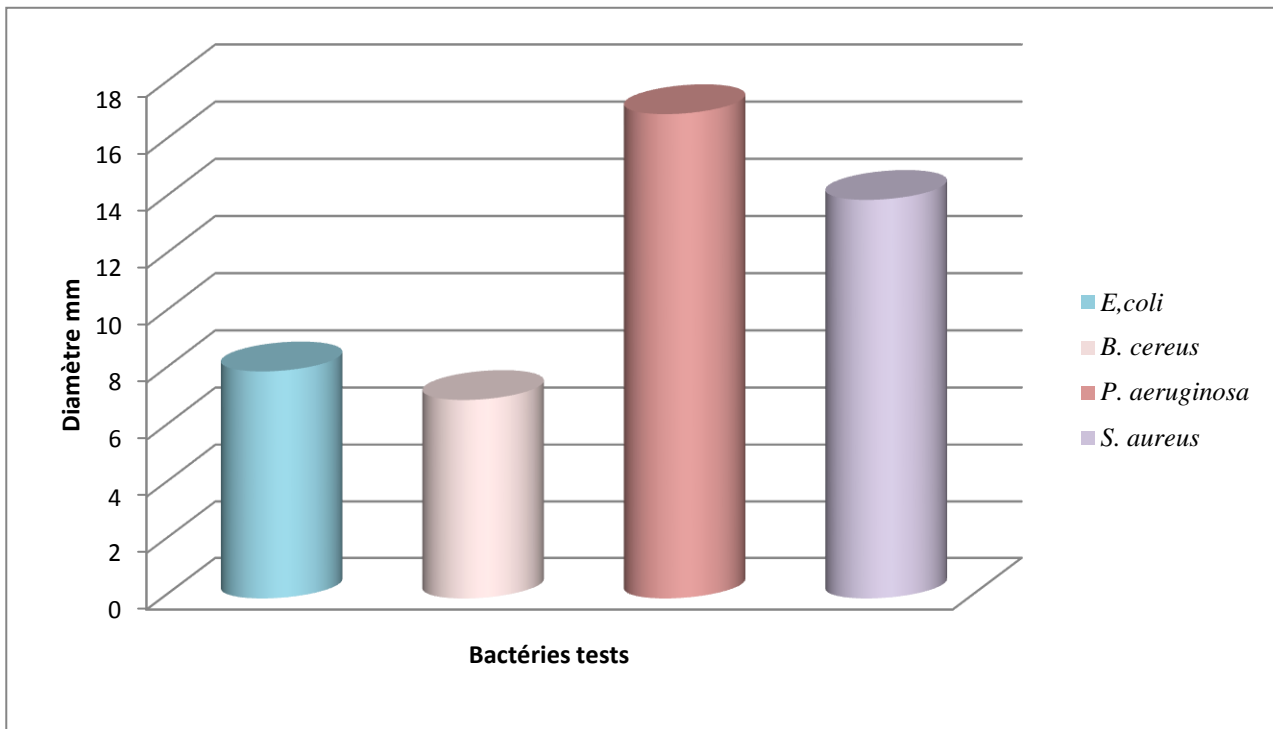


Figure 15: La variation de la zone d'inhibition entre la souche *Asperjellus flavus* et les différentes bactéries tests

➤ La souche *Penicillium sp*

La variation de la zone d'inhibition entre la souche *Penicillium sp* et les différentes bactéries tests *Escherichia coli* Gram négatif, *Bacillus cereus* Gram positif, *Pseudomonas aeruginosa* Gram négatif, *Staphylococcus aureus* Gram positif.

Les résultats suivants montrent que :

- La souche *Penicillium sp* a une activité considérable avec la bactérie *P. aeruginosa* et elle a créé une zone d'inhibition de diamètre de 15 mm.
- La souche *Penicillium sp* a une activité connue avec les bactéries *B. cereus* et *S. aureus*, elle a créé une zone d'inhibition de diamètre de 10 mm avec *S. aureus* et une zone d'inhibition de diamètre de 9 mm avec *B. cereus*.
- Mais avec la bactérie *E. coli*, la souche *Penicillium sp* n'a aucun effet parce qu'il n'y a pas une zone d'inhibition.

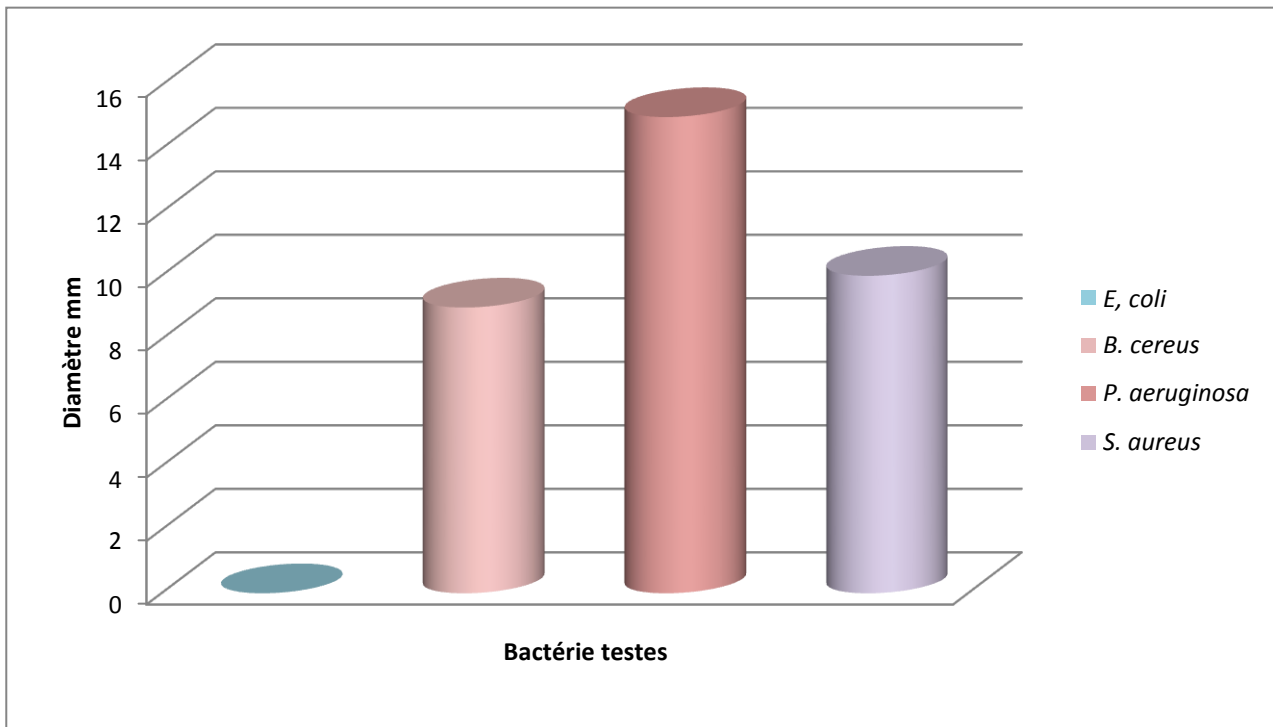


Figure 16: La variation de la zone d'inhibition entre la souche *Penicillium sp* et différentes bactéries tests.

➤ La souche *Alternaria sp*

La variation de la zone d'inhibition entre la souche *Alternaria sp* et les différentes bactéries tests *Escherichia coli* Gram négatif, *Bacillus cereus* Gram positif, *Pseudomonas aeruginosa* Gram négatif, *Staphylococcus aureus* Gram positif.

Les résultats suivants montrent que :

- Avec la bactérie *S. aureus*, la souche *Alternaria sp* présente une bonne activité antibactérienne et elle a créé un diamètre d'inhibition de 16 mm.
- Avec la bactérie *P.aeruginosa*, La souche *Alternaria sp* présente une activité antibactérienne connue et elle a créé un diamètre d'inhibition de 10 mm.
- La souche *Alternaria sp* ne présente pas une activité antibactérienne avec les bactéries *E. coli* et *B.cereus*, elle n'a aucun effet parce qu'il n'y a pas une zone d'inhibition.

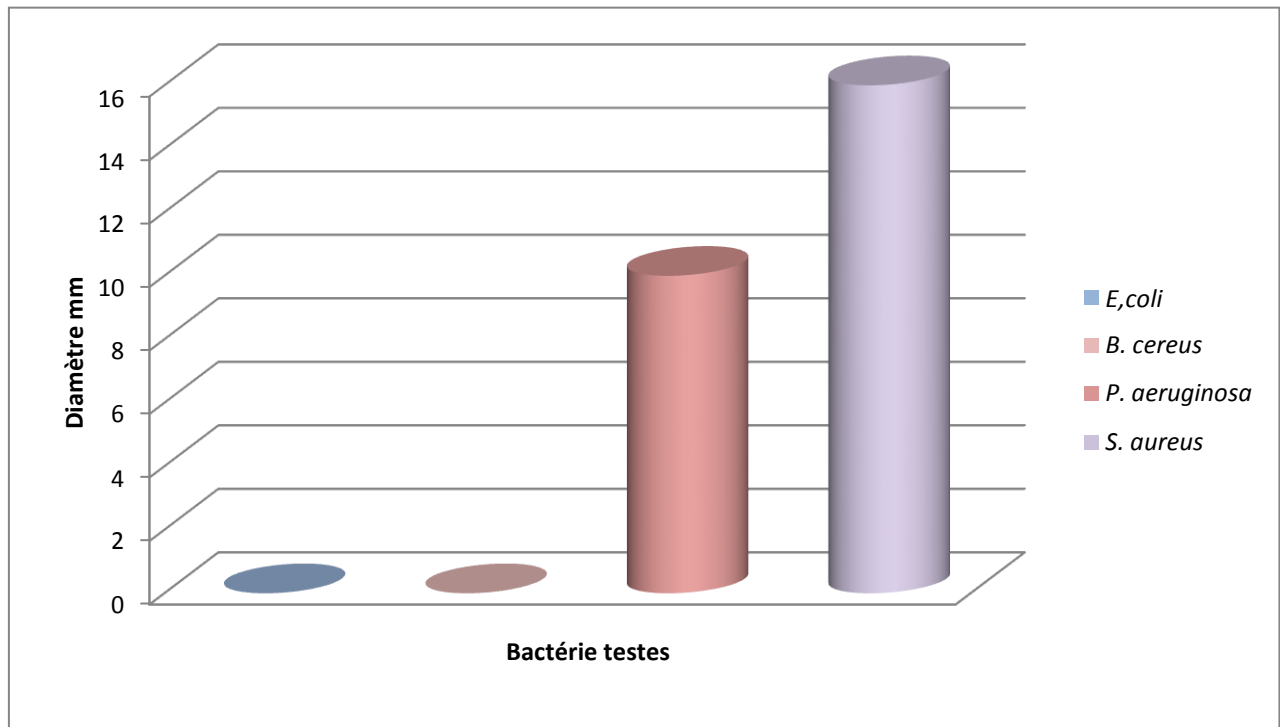


Figure 17: La variation de la zone d'inhibition entre la souche *Alternaria sp* et différentes bactéries tests

➤ La souche *Alternaria alternata*

La variation de la zone d'inhibition entre la souche *Alternaria Alternata* et différentes bactéries tests *Escherichia coli* Gram négatif, *Bacillus cereus* Gram positif, *Pseudomonas aeruginosa* Gram négatif, *Staphylococcus aureus* Gram positif.

Les résultats montrent que :

- La souche *Alternaria alternata* présente une faible activité antibactérienne avec les bactéries Gram positif *B. cereus* et *S. aureus*, elle a créé un diamètre d'inhibition de 6 mm.
- La souche *Alternaria alternata* ne présente pas une activité antibactérienne avec les bactéries Gram négatif *E. coli* et *P. aeruginosa*, elle n'a aucun effet parce qu'il n'y a pas une zone d'inhibition.

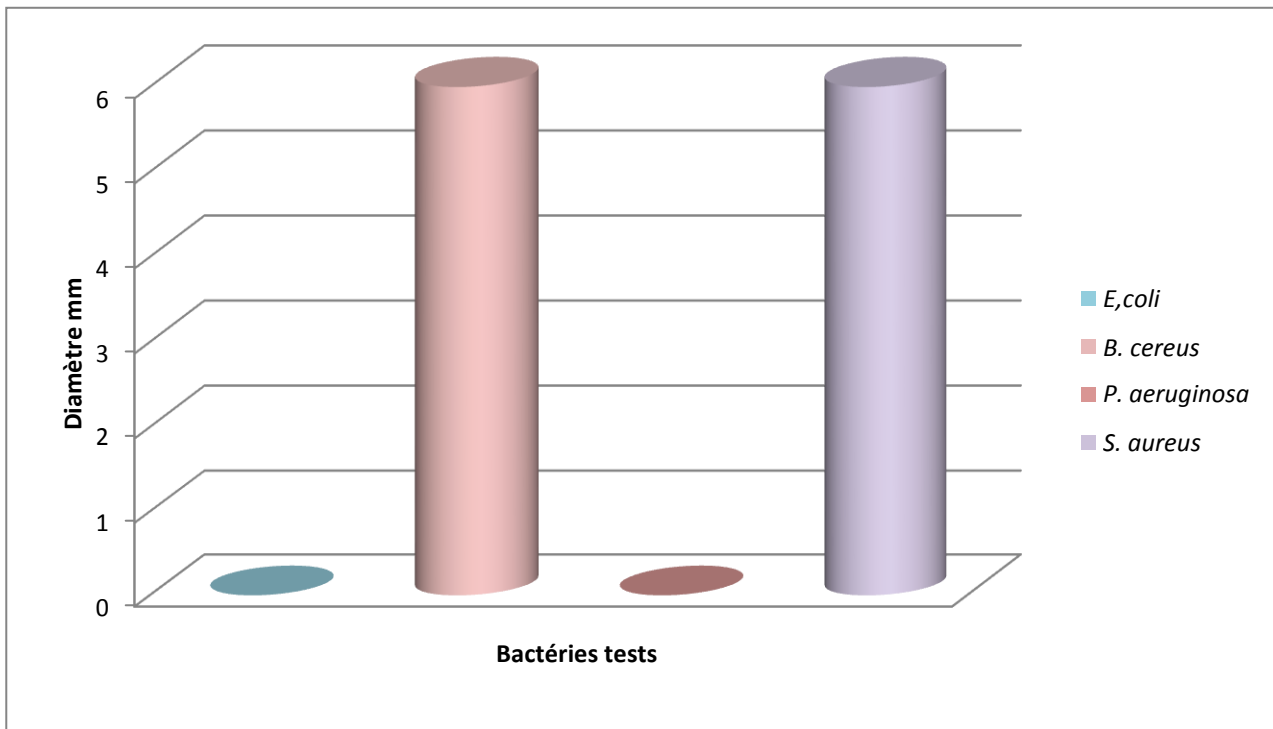


Figure 18: La variation de la zone d'inhibition entre la souche *Alternaria alternata* et différentes bactéries tests

3.2. Techniques des disques et des puits

Ces deux techniques consistent à étudier l'effet des métabolites secondaires des souches fongiques diffusés dans un milieu de fermentation liquide.

La production des métabolites secondaires, par les souches antagonistes, et la mise en évidence de leur activité antibactérienne.

3.2.1. Technique des disques

La sensibilité aux MSFB (Métabolites secondaires fongiques bruts) est déterminée selon le diamètre de la zone d'inhibition. Concernant cette technique, les résultats montrent que les filtrats de la souche *Penicillium sp*, présentent une activité contre les 4 bactéries tests. Contrairement la souche *A. flavus* a aucun effet avec les bactéries *B. cereus* et *S. aureus*, et elle a un effet avec *E. coli* et *P. aeruginosa*.

Chez la bactérie *S. aureus* seulement la souche *Alternaria sp* présente une activité et chez la bactérie *B. cereus* seulement la souche fongique *Alternaria alternata* présente une activité (figure 19).

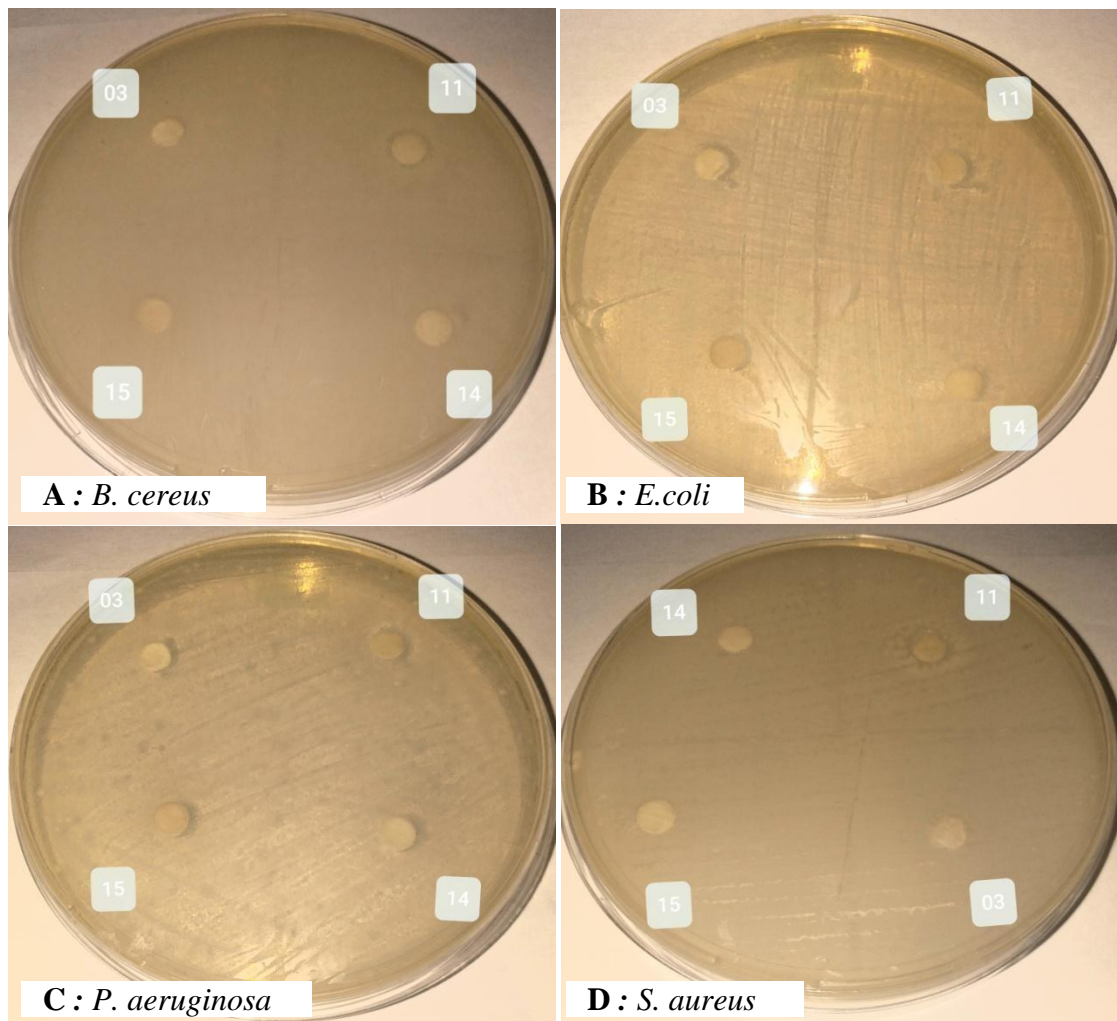


Figure 19 : Activité antibactérienne des quatre souches fongiques par la technique des disques :**(A)** *Bacillus cereus*; **(B)** *Escherichia coli*; **(C)** *Pseudomonas aeruginosa*; **(D)** *Staphylococcus aureus*

L'activité antibactérienne des quatre souches fongiques par la technique des disques avec les bactéries *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus* présente par la création de la zone d'inhibition.

Le tableau suivant résume les résultats obtenus :

Tableau 05: L'activité antibactérienne par technique du disque des isolat, vis-à-vis des quatre bactéries test

Les souches fongiques	L'activité antibactérienne de l'isolat, vis-à-vis des quatre bactéries tests			
	<i>E. coli</i>	<i>B. cereus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>
<i>A. flavus</i>	+	-	+	-
<i>Penicillium sp</i>	+	+	++	+
<i>Alternaria sp</i>	-	-	-	+
<i>Alternaria alternata</i>	-	+	-	-

➤ **La souche *A.flavus***

Les résultats suivants montrent que la variation de la zone d'inhibition entre la souche *Aspergillus. flavus* et les différentes bactéries tests *Escherichia coli* Gram négatif, *Bacillus cereus* Gram positif, *Pseudomonas aeruginosa* Gram négatif et *Staphylococcus aureus* Gram positif.

- La souche fongique *Aspergillus. flavus* ne présente pas une activité antibactérienne avec les bactéries Gram positif *S. aureus* et *B.cereus*, elle n'a aucun effet parce qu'il n'y a pas une zone d'inhibition.
- Mais avec les bactéries de Gram négatif *E. coli*, *P. aeruginosa*, La souche fongique *Aspergillus flavus* présente une activité antibactérienne et elle a créé une zone d'inhibition de 7 mm de diamètre. (figure20)

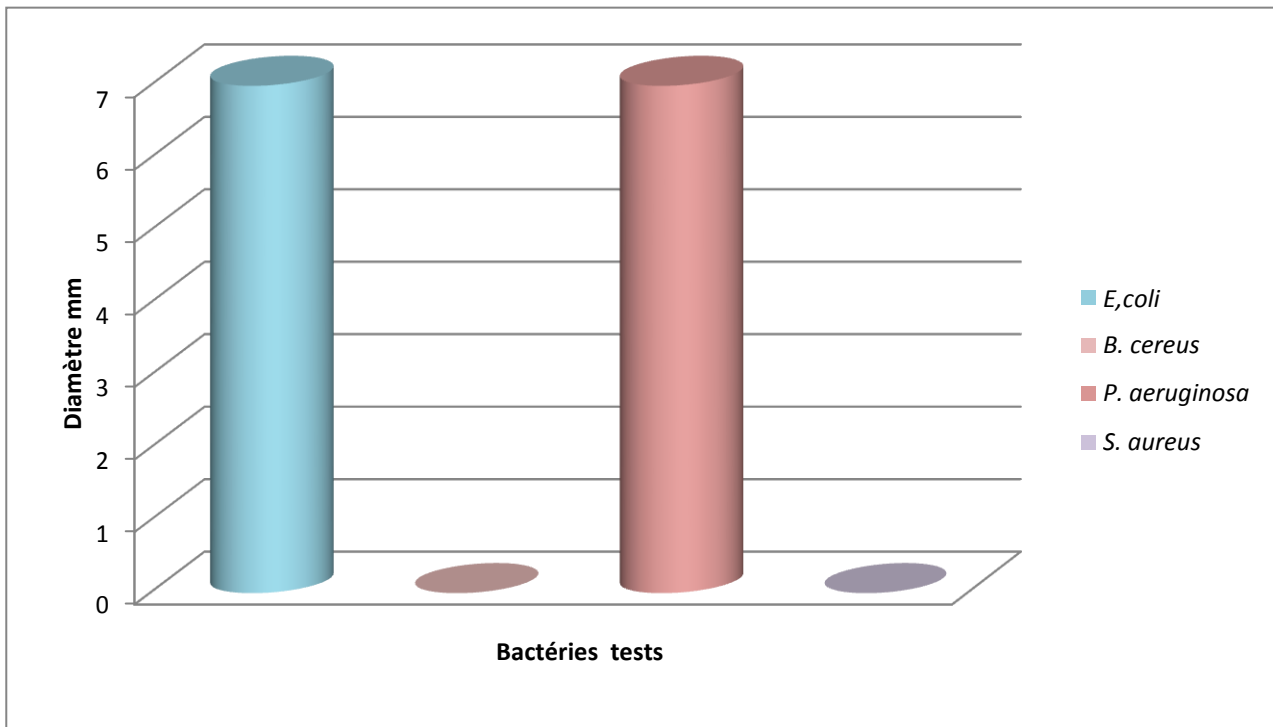


Figure 20: La variation de la zone d'inhibition entre la souche *A. flavus* et différentes bactéries tests

➤ La souche *Penicillium sp*

Les résultats suivants montrent que la variation de la zone d'inhibition entre la souche *Penicillium sp* et les différentes bactéries tests *Escherichia coli* Gram négatif, *Bacillus cereus* Gram positif, *Pseudomonas aeruginosa* Gram négatif et *Staphylococcus aureus* Gram positif.

- la souche *Penicillium sp* a une activité considérable avec la bactérie *E. coli* et elle a créé une zone d'inhibition de diamètre de 9 mm.
- la souche *Penicillium sp* a une activité connue avec la bactérie et *B. cereus*, elle a créé une zone d'inhibition de diamètre de 7 mm.
- la souche *Penicillium sp* a une activité connue avec la bactérie *P. aeruginosa*, elle a créé une zone d'inhibition de diamètre de 10 mm.
- la souche *Penicillium sp* a une activité connue avec la bactérie *S.aureus*, elle a créé une zone d'inhibition de diamètre de 8 mm. (Figure 21)

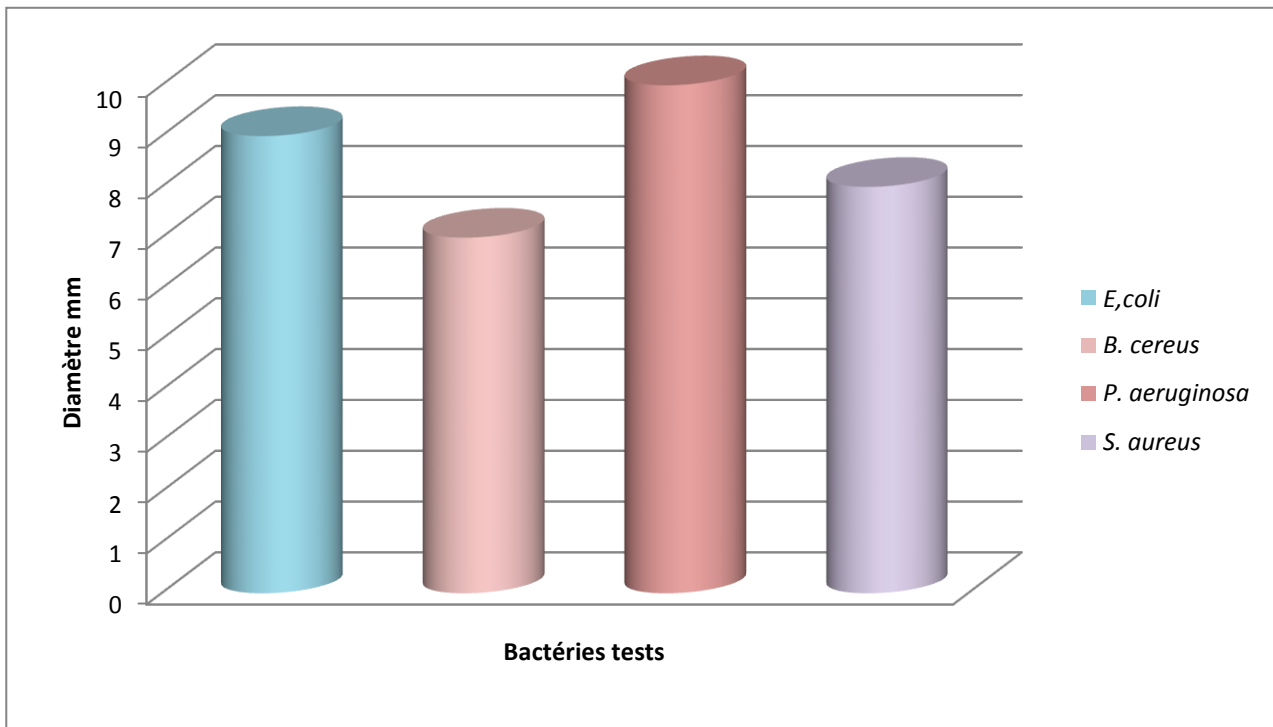


Figure 21: La variation de la zone d'inhibition entre la souche *Penicillium Sp* et les différentes bactéries tests

➤ La souche *Alternaria sp*

La variation de la zone d'inhibition entre la souche *Alternaria sp* et les différentes bactéries tests deux bactéries de Gram négatif *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*, et deux bactéries de Gram positif *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*.

Les résultats montrent que :

- La souche *Alternaria sp* ne développe aucune activité antibactérienne avec les bactéries de Gram négatif *E. coli* et *P. aeruginosa* et la bactérie de Gram positif *B. cereus* absence d'une zone d'inhibition
- La souche *Alternaria sp* a une faible activité antibactérienne avec la bactérie *S. aureus* et elle a créé une zone d'inhibition de diamètre de 6 mm.

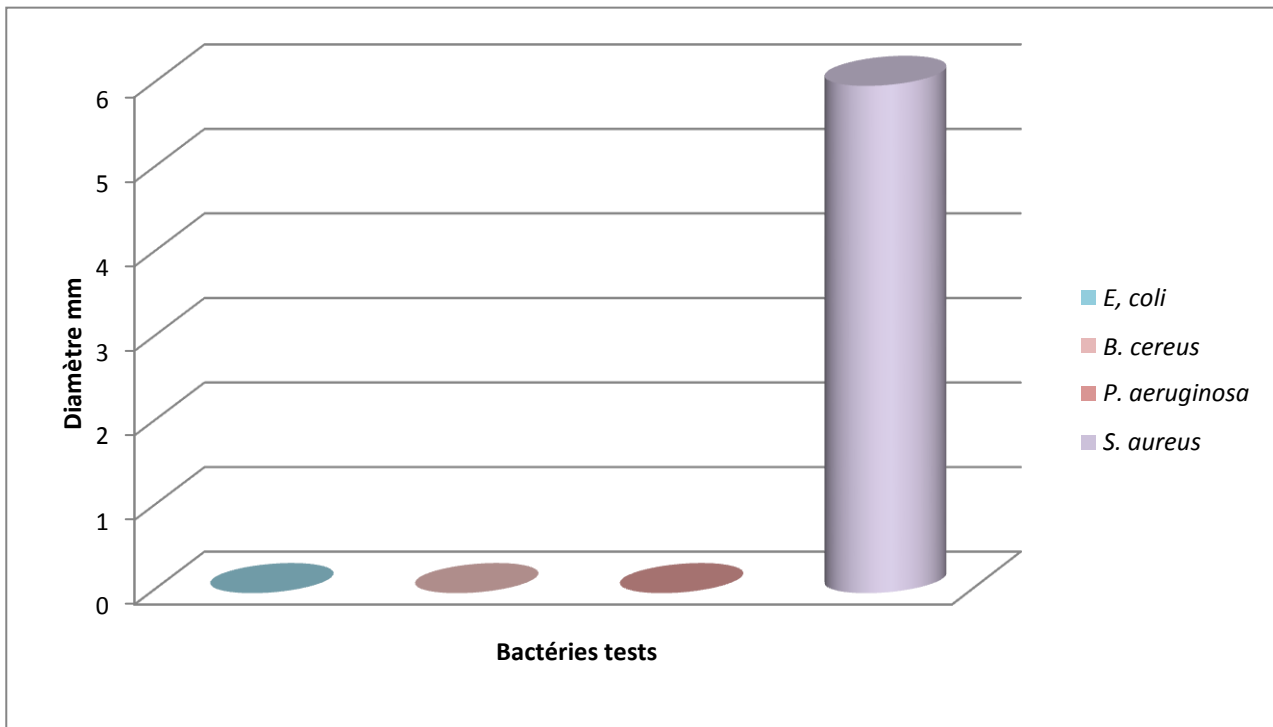


Figure 22: La variation de la zone d'inhibition entre la souche *Alternaria Sp* et les différentes bactéries tests

➤ La souche *Alternaria alternata*

Selon les résultats obtenus de la variation de la zone d'inhibition entre la souche *Alternaria Alternata* avec les différentes bactéries tests deux bactéries de Gram négatif *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*, et deux bactéries de Gram positif *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*.

On a constaté que :

- La souche *Alternaria alternata* a une activité antibactérienne faible avec la bactérie *B. cereus* et elle a créé une zone d'inhibition de diamètre de 6 mm.
- Mais avec les bactéries *S. aureus*, *E. coli* et *P.aeruginosa*, la souche fongique *Alternaria Alternata* ne développe aucune activité antibactérienne, une absence d'une zone d'inhibition avec les trois bactéries.

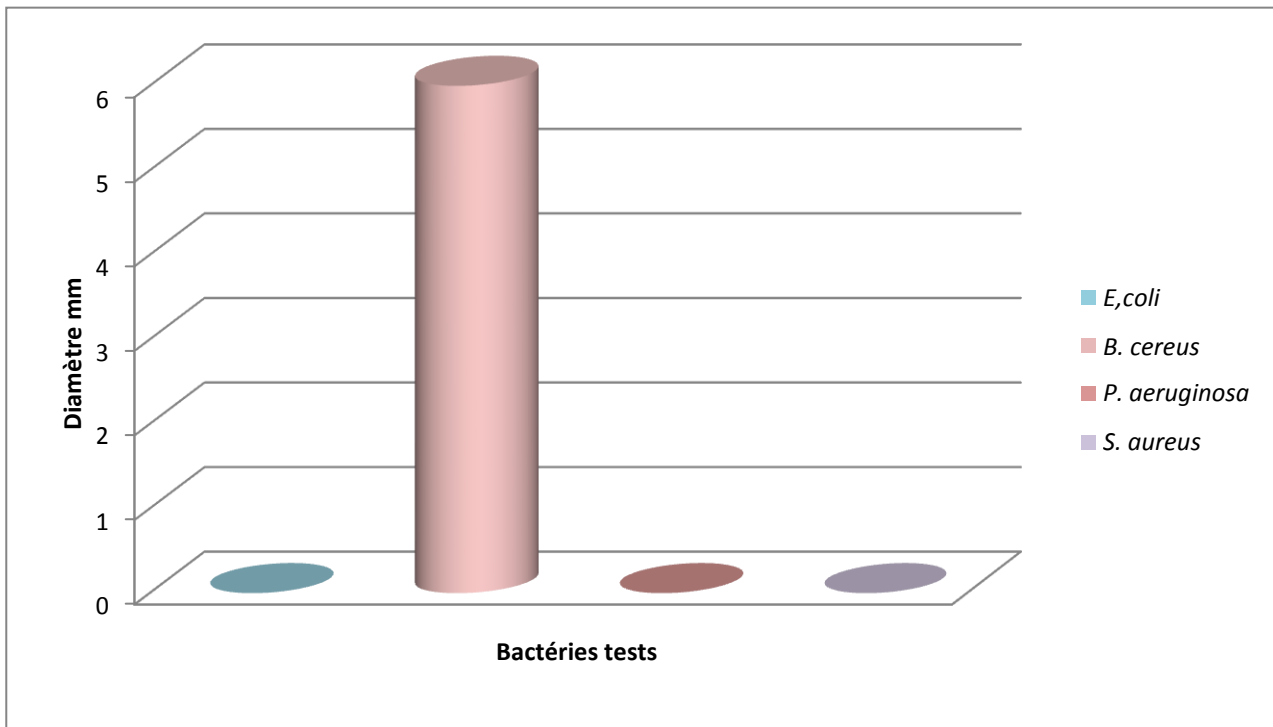


Figure 23: La variation de la zone d'inhibition entre la souche *Alternaria alternata* et différentes bactéries tests.

3.2.2. Techniques des puits

Pour cette technique on a remarqué que l'extrait la souche fongique *Penicillium sp* a une bonne activité antibactérienne avec les quatre bactéries *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus*.

Concernent les autres souches *Aspergillus flavus*, *Alternaria sp* elles ont une activité considérable avec les quatre bactéries et la souche *Alternaria alternata* a une bonne activité antibactérienne avec *P. aeruginosa* et une activité considérable avec les trois bactéries *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus* (Figure 24).

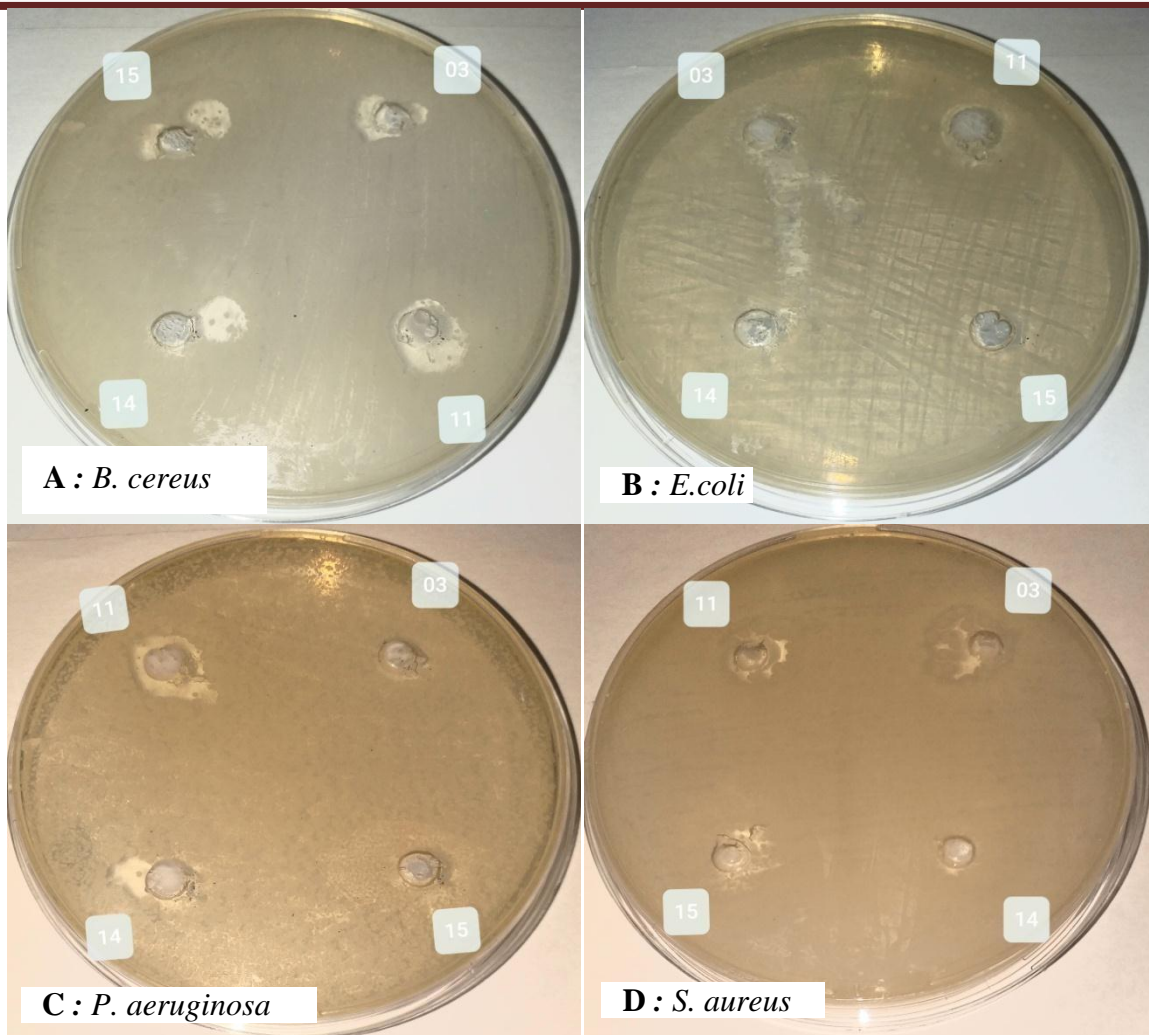


Figure 24 : Activité antibactérienne des quatre souches fongiques par la technique des puits :**(A)** *Bacillus cereus* ; **(B)** *Escherichia coli*; **(C)** *Pseudomonas aeruginosa*; **(D)** *Staphylococcus aureus*

L'activité antibactérienne des quatre souches fongiques *Aspergillus flavus*, *Penicillium sp*, *Alternaria sp* et *Alternaria alternata* par la technique des disques avec les bactéries *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus* présente par la création de la zone d'inhibition.

Le tableau suivant montre les résultats obtenus :

Tableau 06 : L'activité antibactérienne des isolats, vis-à-vis des quatre bactéries test

Les souches fongiques	L'activité antibactérienne de l'isolat, vis-à-vis des quatre bactéries tests			
	<i>E. coli</i>	<i>B. cereus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>
<i>A. flavus</i>	++	++	+	++
<i>Penicillium sp</i>	++	++	+++	++
<i>Alternaria sp</i>	+	++	++	+
<i>Alternaria alternata</i>	+	++	+++	++

➤ **La souche *Aspergillus flavus***

Les résultats suivants montrent qu'il ya une variation de la zone d'inhibition entre l'extrait de la souche *Aspergillus. flavus* et les différentes bactéries tests *Escherichia coli* Gram négatif, *Bacillus cereus* Gram positif, *Pseudomonas aeruginosa* Gram négatif et *Staphylococcus aureus* Gram positif.

On remarque que :

- L'extrait de la souche fongique *Aspergillus flavus* présente une activité antibactérienne considérable avec les quatre bactéries, on a observé qu'elle a crée une zone d'inhibition :
 - ✓ Avec *E. coli* un diamètre de 11 mm.
 - ✓ Avec *B. cereus* un diamètre de 10 mm.
 - ✓ Avec *P. aeruginosa* un diamètre de 9 mm.
 - ✓ Avec *S. aureus* un diamètre de 11 mm.

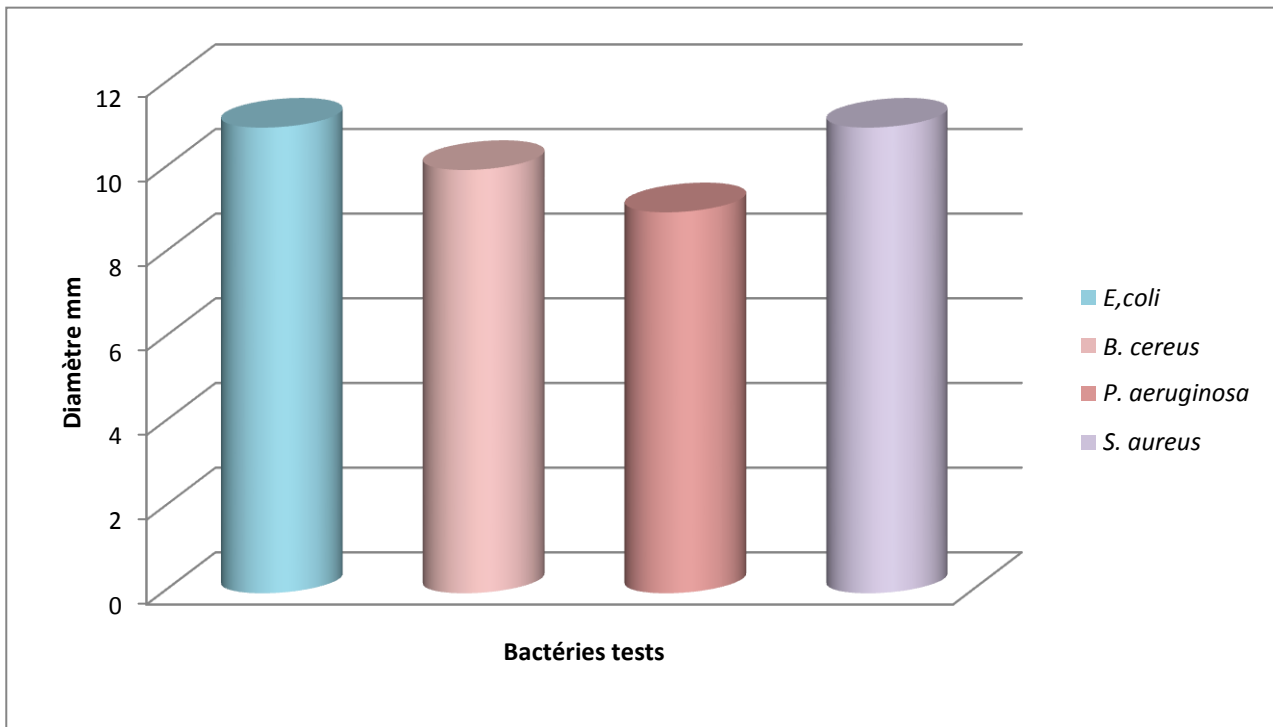


Figure 25: La variation de la zone d'inhibition entre la souche *A. flavus* et les différentes bactéries tests

➤ La souche *Penicillium sp*

Il ya une différence de la zone d'inhibition entre l'extrait de la souche *Penicillium sp* et les différentes bactéries tests *Escherichia coli* Gram négatif, *Bacillus cereus* Gram positif, *Pseudomonas aeruginosa* Gram négatif, *Staphylococcus aureus* Gram positif.

Les résultats suivants montrent que :

- L'extrait la souche *Penicillium sp* a créé une bonne une activité antibactérienne avec la bactérie *P. aeruginosa*, on a observé qu'elle a créé une zone d'inhibition de 16 mm de diamètre.
- Aussi cet extrait a donné une bonne activité antibactérienne avec les bactéries *E. coli* et *B. cereus*, il a crié une zone d'inhibition de 14 mm de diamètre avec *E. coli* et un diamètre de 13 mm avec *B. cereus*.
- Avec la bactérie Avec *S. aureus*, L'extrait la souche *Penicillium sp* a créé une activité antibactérienne considérable, il a développé une zone d'inhibition de 10 mm.

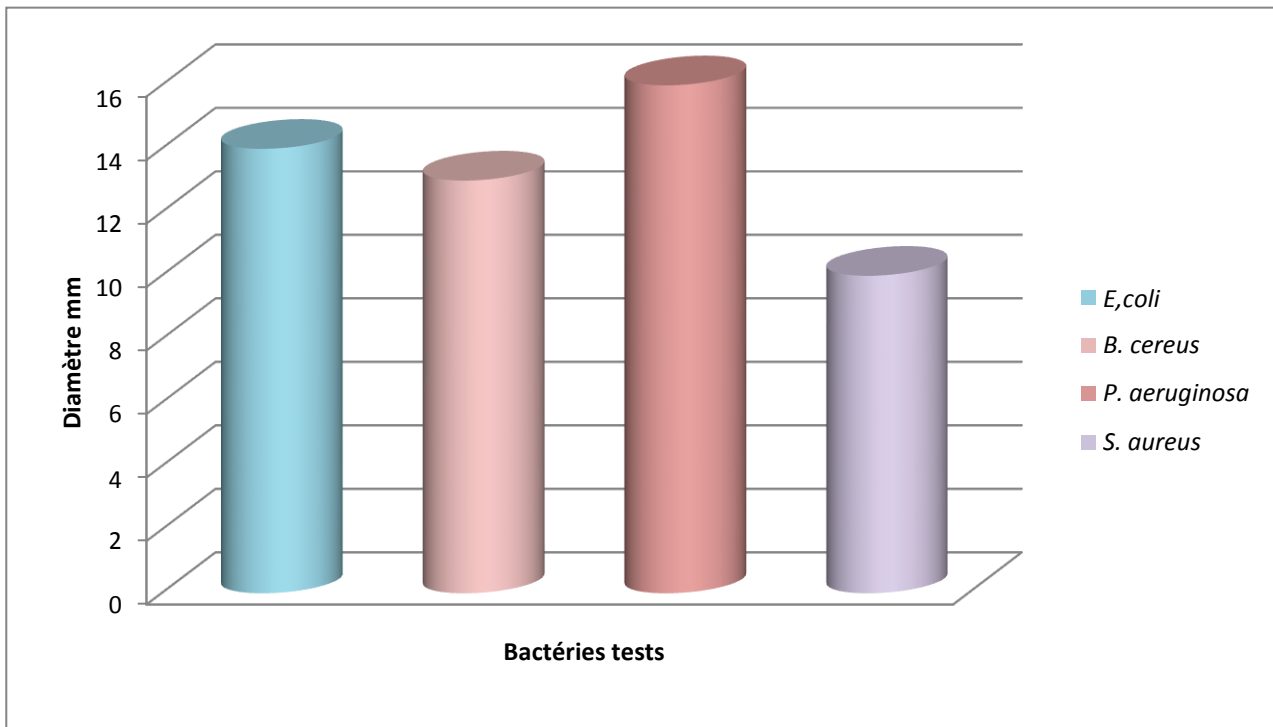


Figure 26: La variation de la zone d'inhibition entre la souche *Penicillium sp* et les différentes bactéries tests

➤ La souche *Alternaria sp*

Une variation de la zone d'inhibition a été observée entre l'extrait de la souche *Alternaria sp* et les différentes bactéries tests deux bactéries de Gram négatif *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*, et deux bactéries de Gram positif *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*.

Les résultats montrent que :

- Avec la bactérie de Gram négatif *P. aeruginosa*, l'extrait de la souche fongique *Alternaria sp* présente une activité antibactérienne considérable et elle a créé une zone d'inhibition de 11 mm.
- La souche *Alternaria sp* a exercé une activité antibactérienne connue avec la bactérie *B. cereus* et elle a créé une zone d'inhibition de diamètre de 10 mm.
- La souche *Alternaria sp* a une faible activité antibactérienne avec la bactérie *S. aureus* et *E. coli* et elle a créé une zone d'inhibition de diamètre de 7 mm.

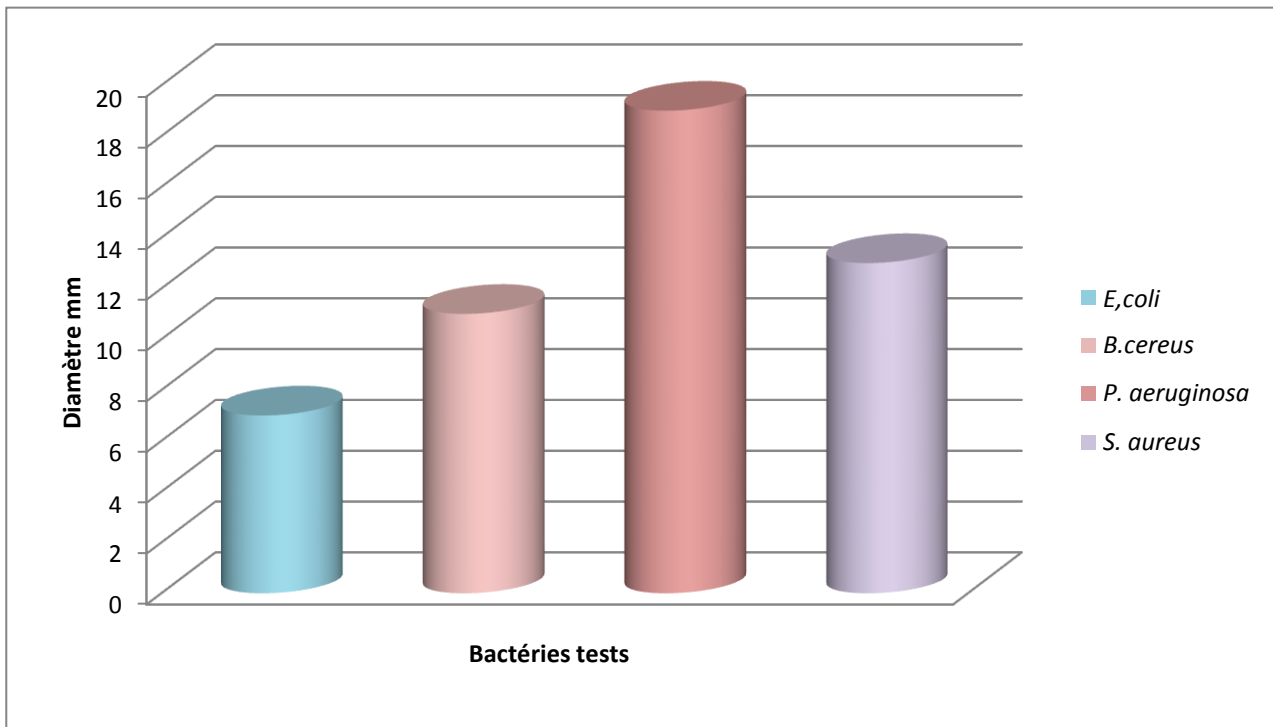


Figure 27: La variation de la zone d'inhibition entre la souche *Alternaria sp.* et différentes bactéries tests

➤ La souche *Alternaria alternana*

Les résultats montrent qu'il y a une variation de la zone d'inhibition entre l'extrait de la souche *Alternaria alternana* et les différentes bactéries tests deux bactéries de Gram négatif *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*, et deux bactéries de Gram positif *Bacillus cereus* et *Staphylococcus aureus*.

On a observé que

- L'extrait de la souche *Alternaria alternana* avec la bactérie de Gram négatif *P. aeruginosa* présente une bonne activité antibactérienne et elle a créé une zone d'inhibition de 19 mm.
- Avec les bactéries *B. cereus*, *S. aureus* l'extrait de la souche fongique *Alternaria alternana* présente une activité antibactérienne considérable et elle a créé une zone d'inhibition de 11 mm avec la bactérie *B. cereus* et une zone d'inhibition de 13 mm avec *S. aureus*.
- l'extrait de la souche fongique *Alternaria alternana* présente une faible activité antibactérienne avec *E. coli* et elle a créé une zone d'inhibition de 7 mm.

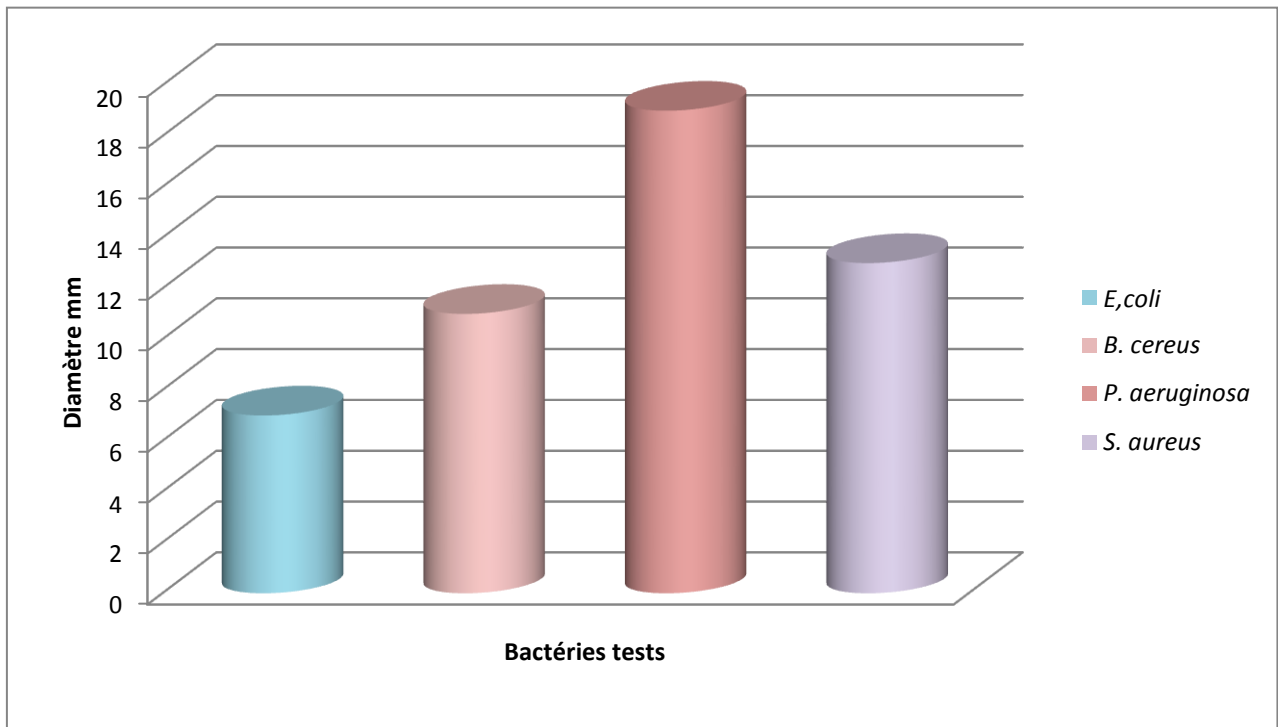


Figure 28: La variation de la zone d'inhibition entre la souche *Alternaria alternana* et les différentes bactéries tests

La mise en évidence de l'activité antibactérienne des isolats dans le milieu Muller Hinton a été faite vis-à-vis de quatre souches bactériennes, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* et *Bacillus cereus* suivants trois technique ; la technique des cylindres d'agar, la technique des disques et la technique des puits. Les résultats obtenus montrent que :

Le genre *Penicillium* présente une activité plus ou moins considérable vis-à-vis les quatre bactéries avec une zone d'inhibition entre 7 à 16 mm par rapport à les autres genres.

Dans la technique des puits les quatre souches présentent une activité plus ou moins considérable vis-à-vis les quatre bactéries avec une zone d'inhibition entre 7mm à 19mm.

Les bactéries *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* ont été les plus affectées où les moyennes des zones d'inhibition atteignent à 7 de 19 mm.

Selon Botton et al. (1990), les espèces de mycètes sont connues par leur production de substances à effet antibactérien, elles produisent, généralement, des métabolites secondaires biologiquement actifs, synthétisés en fin de croissance et possèdent des structures chimiques différentes de celles des protéines. Il est connu que les genres *Aspergillus* et *Penicillium* constituent le réservoir principal de substances antibactériennes.

Nos résultats s'accordent avec ceux de Abdelaziz en 2006 qui a testé et trouvé un effet antibactérien de *Penicillium sp* vis-à-vis d'une bactérie Gram positif *Staphylococcus aureus* avec une zone d'inhibition de 10 mm.

Conclusion
et
Perspectives



L'objectif principal de ce mémoire est la recherche de l'activité antibactérienne élaborée par les moisissures isolées du sol d'une source thermale vis-à-vis de quatre souches bactériennes ; deux à coloration Gram + (*Staphylococcus aureus* ATCC 52952, *Bacillus cereus* ATCC 10987) et deux à coloration Gram - (*Escherichia coli* ATCC 00212 *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853).

Les cultures des prélèvements sur PDA ont permis l'isolement de nouvelles moisissures différentes. Le pouvoir inhibiteur de l'antibiotique au cours de l'isolement ont permis de réduire l'apparition des bactéries.

Pour l'identification des moisissures Thermophile isolées, une étude macroscopique a été réalisée sur milieu PDA et une étude microscopique a été effectuée, cette dernière a permis de déterminer les genres : *Alternaria*, *Aspergillus*, *Penicillium* et *Aureobasidium*, où le genre le plus dominant est : *Alternaria*.

La production des substances antibactérienne, a été testée par trois techniques à savoir la technique des cylindres d'agar, la technique des disques et la technique des puits. Les résultats de ces tests montrent que quatre espèces fongiques testées ont montré un effet antibactérien contre les bactéries testées et que le genre *Penicillium* présente une activité considérable vis-à-vis les bactéries test par rapport aux autres souches fongiques.

En perspective, ce travail est une étape préliminaire pour des études plus larges, plus approfondies et plus accomplies incluant :

- ✓ La purification et l'identification des métabolites bioactifs produits par les souches fongiques thermophiles.
- ✓ La détermination des concentrations minimales inhibitrices des molécules antibactériennes secrétées (CMI).
- ✓ L'optimisation de la biosynthèse des MSFB à des fins médicale.
- ✓ La production des substances antibactériennes à l'échelle industrielle (Scall-up).

Références
bibliographiques



Les références bibliographiques :

1. Abdelaziz, W. (2006). Isolement des mycètes producteurs de substances antibactériennes à partir des sols sahariens. Mémoire de Magistère en microbiologie et biochimie appliquées. Université Mentouri. Constantine. 135p.
2. ACGH. (1999). American Conference of Governmental Industrial Hygienists.
3. Ananthanarayan, Paniker. (2006). Textbook of Microbiology. Edition Seventh, India. 665 pages.
4. Arfaoui, M. (2019). Lutte biologique contre les moisissures toxigènes. Thèse de Doctorat en science biologique. Université Tunis El Manar.
5. Arnaud, C. (2014). Identification des moisissures. arnaud.carlotti@idmyk.com. La Vague, 42 : 3p.
6. Avril, J.L., Dabarnet, H., Denis, F., Onteil, H. (1992). Bacteriologie clinique. 2ème édition. Ellipses, Paris. 9-31.
7. Badillet, G., Briève, C., Guého, E. (1987), Champignons contaminants des cultures, champignons opportunistes, Atlas clinique et biologique, vol II, Ed VARIA, Paris.
8. Benahmed M, (2017), Effet des précipitations sur la distribution du zn⁺ et du pb⁺ issus de retombées atmosphériques dans le sol : cas de la fonderie de tiaret (alfet). thèse de doctorat en sciences, université djillali liabes de sidi bel abbes, 174p.
9. Berche p, Gaillard J, Simonet M (1989). Les bactéries des infection humaines .1 : 100-101-102- 123-236-274.
10. Berthelin, J., et Leyval, C., (2000). Contamination des milieux par les éléments en traces. Les conséquences sur les sols et les eaux superficielles. C.R. Agric. Fr., 86, 25-37.
11. Betina V. (1989). Bioactive molecules: Mycotoxins - chemical, biological and environmental aspects Elsevier Science Publishers, Amsterdam, The Netherlands Vol. 9.
12. Blochl E., Rachel R., Burgraff S., Hafendbradl., Jannasch H.W and Stetta O.(1997). Pyrolobusfumarii gen and sp. Nov presents a novel group of and archea. Extending the upper temperature limite for life to 113°C .Extremophiles. Vol 1: 14-22.
13. Boiron P. (1996). Organisation et biologie des champignons. Edition : NATHAN, Paris, 11- 16, 28-39, 99-101.
14. Botton B., Breton A., Fèvre M., Gauthier S., Guy P., Larpent J.P., Reymond P., Sanglier J.J., Vayssier Y., Veau P., (1990), Moisissures utiles et nuisibles, Importance industrielle, Ed. Masson, Paris.
15. Bouchet, P ; GUIGNARD, J-L ; POUCHUS, Y-F ; VILLARS, J. (2005). les champignons, mycologie fondamentale et appliquée. Paris : Masson, ISBN : 2-294-02116-9.

16. Boudra, H., (2009) - Les mycotoxines dans les fourrages : un facteur limitant insidieusement la qualité des fourrages et les performances des ruminants. *Fourrages*, 199, 265-280.
17. Bourgeois, C. M. Mescle, J. F. et Zucca, J. (1989). *Microbiologie alimentaire. Aspect microbiologique de la sécurité et de la qualité des aliments*. Lavoisier, France, pp 216-244.
18. Boutibonnes P., Auffray Y., Malherbe C., Kogbo W., Marais C., (1984) – Propriétés antibactériennes et génotoxiques de 33 mycotoxines. *Mycopathologia* 87, 43-49 pp.
19. Brock T.D. (1995). The road to yellow stone and beyond .*Annu. Rev. Microbiol.* 49 : 1-28.
20. Cahagnier B., Dragacci S., Frayssinet C., Frémy J-M., Hennebert G-L., Lesage- Meessen L., Multon J-L., Richard-Molard D., Roquebert M-F. (1998). *Moisissures des aliments peu hydratés*. Edition : Tec&Doc Lavoisier. France. 225p.
21. Calvo A.M., Wilson R.A., BockJ.W and Keller N.P (2002). Relationship between secondary metabolism and fungal development. *Microbiol.Mol.Bio.Rev.* 66 : 447-459.
22. Campbell C.K., Johnson E.M., Philpot C.M., Warnock D.W. (1996). Identification of pathogenic fungi, Public Health Laboratory Service.
23. Chabasse D, et al (2002). Les moisissures d'intérêt médical. *Cahier de formation BIOFORMA.*; N° 25.160 p.
24. Chamayou, H. and Legros J.P. (1989). *Les bases physiques, chimiques et minéralogiques de la science du sol*. Paris : Presses universitaires de France Agence de coopération culturelle et technique. 593p.
25. Cooney D.G and Emerson R (1964). *Thermophilic fungi. An account of their biology activities and classification* W.H Freeman & Co –San Francisco – Clife.
26. Darcheville O., (2008). Rôles des composantes géochimiques et microbiologiques d'un sol sur le comportement du sélénium en conditions toxiques et anoxiques. Thèse de doctorat Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse. p : 7-8.
27. Davet, P (1996). *Vie microbienne du sol et production végétale*. Editions Quae.
28. De Vos, P., Garrity, G.M., Jones, D., Krieg, N.R., Ludwig, W., Rainey, F.A., Schleifer, K.H.,Whitman, W.B., (2009). *Bergey'smanual of Systematic Bacteriology – second edition*. Bergey'smanual trust 3.
29. Dealarras C (2007), *Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyse ou de contrôle sanitaire*. Tec &Doc ; éditions médicales internationales, pp 776.
30. Delarras C (2014), *pratique en microbiologie de laboratoire recherche de bactéries et de levures-moisissures*, 757p.
31. Demain A and Fang A. (2000). The natural functions of secondary metabolites .*Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 69 : 1-39.

32. Diehl, R. (1974). Agriculture générale .Ed.J.B, Baillière, Paris, 396 p.
33. Dommergues, Y (1977). 2ème éd La biologie des sols, Ed. Que sais-Je ?, Presse Universitaire France.
34. E., Tanaka K., Bruker G., Chazalet V., Coleman D., Debeaupuis J.P., Hanazawa R., Latgé J.P., Lortholary J., Makimura K., Morrison C.J., Murayama S.Y., Naoe S., Paris S., Sarfati J., Shibuya K., Sullivan D., Uchida K., Yamaguchi H . (1998). Molecular diagnosis and epidemiology of fungal infections, Vol : 36, 249-257p. responsible species, Mycoses, Vol :35, 109-114p.
35. Edwin,W. Browne, RE, Cotton, JV, Firestone, AE, Guinther, R., Kelly, WA, Rogers, GW, ... & Russell, CD (1942). RAPPORT DE L'ASSOCIATION DU BARRE DE L'OHIO.
36. Etzel .R.A. (2002). Mycotoxins. JAMA. Vol : 4. 425 – 427p. 297p
37. Feuilhade de Chauvin M. (2005). New diagnostic techniques, J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol., vol :19, 20-24p.
38. Filtenborg O., Frisvad J.C. etThrane U., (1996). Moulds in food spoilage. International Journal Of Food Microbiolog. Vol : 33; 85-102p.
39. Fleming, A. (1929). Sur l'action antibactérienne des cultures d'un pénicillium, avec une référence particulière à leur utilisation dans l'isolement de B. influenzae. Journal britannique de pathologie expérimentale, Vol :10 (3), 226p.
40. Freney J, Kloos W, Hajek V, Webster J, Bes M, Brun Y, VernozyRozand C. (1999). Recommended minimal standers for description of new *Staphylococcal* species. International Journal of Systematic Bacteriology Vol:49, 489-502p.
41. FRISVAD, Jens- C. (2005). Halotolerent and halophilic fungi and their extrolite production.
42. Galtier N. and Korby J.R. (1997). Relationships between genomic G+C content, secondary structures and optimal growth temperature in prokaryotes. J. M. Evol. Vol : 44 ;632p.
43. Glistler, Géorgie (1941). Un nouvel agent antibactérien produit par une moisissure. Nature , Vol :148 , 470-470p.
44. Grosjean J., Clavé D., Archambaud M., Pasquier C. (2011). Bactériologie et virologie pratique. Paris : 2e édition révisée, isbn 978-2-8041-6398-3;. 73-77p ; 166-169p.
45. Guiraud J P., &Rosec J P., (2004)- Pratique des normes en microbiologie alimentaire, Ed. AFNOR, Saint-Denis-la-plaine, France, 300pp.
46. Guiraud J-P. (1998). Microbiologie alimentaire. Edition : Dunod, Paris, 7-9, 98-100 p.
47. Hamid S, (2015). Isolement et caractérisation de souches fongiques entomopathogènes locales du groupe des hyphomycètes et application sur le moustique responsable des arboviroses, thèse de doctorat. 200p.

48. Hapwood D.A. (1988). Toward's and understanding of gene switching in *Streptomyces*, the basis of sporulation and antibiotic production. Proc.R. Soc.Land B. Vol : 235; 121-138p.
49. Hawksworth D.L., Kirk P.M., Sutton B. and Pegler D.N. (1995). Dictionary of the fungi , 8th ed. CAB.International Walling Ford. UnitedKingdom.Hibbett, D. S. 2007. A higher level phylogenetic classification of the Fungi.
50. Hendey K.H. and Cole C.E. (1993). Areviws of mycotoxins in indoor air. J.Toxical. Environ. Health. 38 (2): 183- 198.
51. Hinrikson H.P., Hurst S.F., De Aguirre L., Morrison C.J. (2005). Molecular methods for the identification of *Aspergillus* species, 43 (1), 129-137p.
52. Jae-HyukY .and Keller N.P. (2005). Regulation of secondary metabolisme in filamentous fungi .Ann. Rev. Phytopathol. 43: 437- 458p.
53. Jaenicke R. (1996). Stability and folding of ultrastable, proteins eye lens crystallins and enzymes from thermophiles .FASEB.10: 84-92p.
54. Jin J., Lee Y.K., Wickes B.L. (2004). NOTES Simple Chemical Extraction Method for DNA Isolation from *Aspergillus fumigatus* and Other *Aspergillus* Species, J. Clin. Microbiol., 42 (9), 4293-4296p.
55. Larry M, Buch, MD, Affiliate Professor of Cliniral Biomedical Science, Chareles E, Schnude College of Medcines, Flurida Atlantse Eniversites ; Affiliate Associale Professor of Medcine, University of Miami-Miller School of Medicine.
56. Laure M., Guillou J. (2016). *Escherichia coli* revisité, ami ou ennemi ; Laboratoire de bactériologie du CHU Angers ; N°486 // 27.
57. Laurence Belgarbi-Dutron, (2012), Morphologie de la levure *Alternaria alternata*.
58. Lee, S. Y., & Chang, H. N. (1995). Production of poly (3-hydroxybutyric acid) by recombinant *Escherichia coli* strains: genetic and fermentation studies. Canadian journal of microbiology, 41(13), 207-215p.
59. Leyral G., Vierling E. 2001. Microbiologie et toxicologie des aliments : Hygiène et sécurité alimentaires. 3ème Edition, DOIN, Paris, 15-20, 268p.
60. Madigan M.T., Matinko J.M et Parker J. (1997). Brokbiology of microorganisms, 8th Edition. USA.
61. Maheshwari R., Bradwa J.G and Bhat M.K. (2000). Thermophilic fungi their physiology and enzymes. Microbiology and MolecularBiologuyReviws. 64(3): 461- 488p.
62. Mapleston R.A., Stone H.G. and Williams P.H. (1992). The evolutionary rol of secondary metabolite.AREVIEW.Gen. 115:151-157p.

63. Melling, J., Capel, B.J., Turnbull, P.C.B., Gilbert, R.J., (1976). Identification of a novel enterotoxigenic activity associated with *Bacillus cereus*. *J. Clin. Pathol.* Vol :29, 938-940p.
64. Mérens A., Jault P., Bargues L., Cavallo J-D. (2013) Infections à *Pseudomonas aeruginosa* EMC - Maladies infectieuses Volume 10.
65. Moreau C. (1976) Moisissures toxiques dans l'alimentation. 2ème édition de Masson et CIE.. Pages : 3-11, 31-70 et 181-184p.
66. Moroh, J. L. A. (2013). Résistance bactérienne et phytomolécules antimicrobiennes issues de Morindamorindoides (Doctoral dissertation, Université de Bretagne occidentale-Brest).
67. Mortimer, P.R., McCann, G., (1974). Food-poisoning episodes associated with *Bacillus cereus* in fried rice. *Lancet* Vol :1, 1043-1045p.
68. Mouchacca J. (1997). Thermophilic fungi . Biodiversity and Taxonomic Status. *Cryptogamies . Mycol.* Vol :18:19-69p.
69. Mouchacca J. (1999). Thermophilic fungi: present taxonomic concepts in thermophilic moulds in biotechnology, (edn) Johri. S.N. Satyanarayana and Oren J .Kluwer. Dordrecht.
70. Mumen M., (2006). Caractérisation du Fonctionnement Hydrique des Sols à l'aide d'un Modèle Mécaniste de Transferts d'Eau et de Chaleur Mis en Ouvre en Fonction des Informations Disponibles sur le Sol. Thèse de doctorat. Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse .p : 6.
71. Nagase N, Sasaki A, Yamashita K, Shimizu A, Wakita Y, Kitai, S, Kawano J. (2001). Isolation and species distribution of staphylococci from animal and human skin. *Journal of Veterinary Medical Science* 64, 245-250.
72. Navel, A. (2006). Distribution, spéciation impact et transfert du cuivre dans un sol sous vigne: rôle de la structuration spatiale et du statut organique (Doctoral dissertation, Université de Grenoble). 253p.
73. NF ISO 15799 (X31-603)., 2004. Qualité du sols—Lignes directrices relatives à la caractérisation écotoxicologique des sols et des matériaux du sol.
74. Nguyen, M. T. (2007). Identification des espèces de moisissures, potentiellement productrices de mycotoxines dans le riz commercialisé dans cinq provinces de la région centrale du vietnam: étude des conditions pouvant réduire la production des mycotoxines (Doctoral dissertation).
75. Nicklin J., Graeme-Cook K., Paget T., Killington R. (2000). L'essentiel en microbiologie. Édition BERTI, Paris, 209- 213p, 215- 217p, 231- 235 p.

76. Pasqualotto, Alessandro – C(2008). Differences in pathogenicity and clinical syndromes due to *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus flavus*. Medical Mycology : SI-S10. iFirst article.
77. Paterson P.J., Seaton S., McLaughlin J., Kibbler C.C. (2003). Development of molecular methods for the identification of *Aspergillus* and emerging moulds in paraffin wax embedded tissue sections, J. Clin. Pathol., Vol :56, 368-370p.
78. Paul singleton 1999 ; Bactériologie, 4ème édition, Dunod, Paris.
79. Peuk A.D. (2000). The chemical composition of xylensapin *Vitis vinifera* L.cv. Riesling during vegetative growth on three different francian vineyard soils and as influenced by nitrogen fertilizer. Am. Enol. Viticult. Vol:51 ;329-339
80. Plésiat P Mérens A., Delacour H., Cavallo J-D., Jeannot K. (2011). *Pseudomonas aeruginosa* et résistance aux antibiotiques Vol : 435.
81. Prescott L-M., Harley J-P., Klein D-A. (1995). Microbiologie. 2ème édition française. Edition : DE BOECK, Bruxelles, 553- 558 p.
82. Prescott, C.E., Chappell, H.N. and Vesterdal. L.,(2000). Nitrogen turn- over in forest floors of coastal Douglas-fir along a gradient in soil nitrogen capital. Citations: 46 .Ecology (In press).
83. Punt P. J., Van Biezen N., Conesa A., Albers A., Mangnus J. & Van den Hondel C. RAMIREZ, C. (1982). Manual and atlas of the *Penicillium*. Elsevier Biomedical Press, Amsterdam.
84. Quinn PJ, Markey BK., Leonard FC., Hartigan P, Fanning S, FitzPatrick ES. (2011). Veterinary Microbiology and Microbial Disease. Edition Blackwell-science, USA. 893p.
85. Rajaskaram A.K. and Maheshwari R. (1990). Effect of growth temperature on lipids composition of a thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus*. Indian j. Exp. Biol. Vol :28 ; 134-137p.
86. Rily R.T. and Norred W.P. (1996): Mechanisms of mycotoxicity. In: The Mycota, Vol. VI (edited by Howard, D.H. and Miller, J.D.), Springer Verlag, Berlin, Germany.
87. Ruark G. H., Zarnoch S. J. (1992). Soil carbon, nitrogen and fine root biomass sampling in a pine stand. Soil Sc. Soc. Am. J. Vol:56 ;1945-1950p.
88. Scott, WJ. (1957) Water relations of food spoilage microorganisms. Advances in Food Research, Vol :7 ; 83–127p.
89. Seye F., Bawine T., Boukraa S., Zimmer J.Y., Ndiaye M., Delvigne F., Francis F. (2014) - Effect of entomopathogenic *Aspergillus* strains against the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum* (Hemiptera: Aphididae) . ORIGINAL RESEARCH PAPER.

90. Sinensky M.(1974). Homoviscousadaptation a home ostatic process that regulator the viscosity of membrane lipids in *Escherechia coli*.Proc.Natl.Acad. Science. USA.Vol :71 ; 522-525p.
91. Smith, CK, Coyea, MR et Munson, AD (2000). Stocks et dynamique du carbone, de l'azote et du phosphore dans les forêts d'épinettes noires perturbées. Applications écologiques , vol:10 , 775-788p.
92. Stenfors A, L.P., Fagerlund, A., Granum, P.E., (2008). Fromsoil to gut: *Bacillus cereus* and itsfoodpoisoningtoxins. FemsMicrobiol. Rev. 32, 579-606.
93. Stone M.J. and Williams D.H. (1992). On the evolution of functional secondary metabolites (Natural products). Mol.Microbiol. Vol6 ; 29-34p.
94. Subler S., Kirsh K.S. (1998).Springdynamic of soilcarbon, nitrogen and microbialactivity in earthwarmmiddens in no-tillcornfield. Bio. Fert. Soils. Vol26 ;243-249p.
95. Tensey M.R. and Brock T.D. (1978). Microbial life at high temperature, aero logical aspect, (edn) Kushner. Life in extreme environments. Academic press.Ltd. London.United Kingdom.
96. Tony B., et Caroline L. (2011). Les contaminations fongiques, Musées, Patrimoine et Culture scientifiques et techniques, 138 : 8p.
97. Tortora J., Funk B.F. and Case Ch.I. (2003). Introduction à la microbiologie, (edn) ISBN.Canada.
98. Uchikoba T., Mase T., Arima K., Yonezawa, H. &Kaneda M. (2001). Isolation and characterization of a trypsine-like protase from Trichodermaviride. Biol. Chem. Vol :382 ; 1509-1513p
99. Walsh, G. (2003). Référentiels biopharmaceutiques—2003. Biotechnologie de la nature , Vol :21 , 865-870p.
100. Webster J., Weber R. (2007). Introduction to fungi. 3^{ème}édition. Cambridge University Press, 841p.
101. Zerigui, F., Mouzaoui, F. (2018). Contribution à l'étude d'*alternariasp.*, agent causal de l'alternariose de la pomme de terre : Prospection, isolement et identification du pathogène, Thème réalisé au laboratoire de protection des végétaux, Université Abdelhamid Ben Badis-Mostaganem, 76p.
102. www.aspergillus.man.ac.uk
103. www.mold-help.org/aureobasidium-pullulans/
104. <https://www.gbif.org/occurrence/2270823254>

Annexes

Annexe 01: Milieux de culture

1. Potato Dextrose AGAR (PDA)

Composition :

- Pomme de terre : 200g
- Glucose : 15g
- Agar : 20g
- Eau distillé... ..compléter jusqu'à 1000ml

Le milieu de culture PDA est favorable pour la croissance des champignons phyto-pathogènes. Voici le protocole utilisé pour la préparation de milieu de culture pour la croissance des champignons :

Préparation :

- ✓ Laver la pomme de terre non pelée. - Couper en cubes dans 500 ml d'eau distillée.
 - ✓ Porter à ébullition pendant 30 – 45 min. - D'autre part faire fondre le glucose dans 500 ml d'eau distillée.
 - ✓ Écraser la pomme de terre, filtrer puis ajouter le filtrat à la solution de glucose.
 - ✓ Ajouter l'agar (4g) sur des flacons de 200 ml (5 flacon).
 - ✓ Compléter le volume à 1000 ml.
 - ✓ Ajouter 200 ml de la solution préparé sur les flacons.
 - ✓ Ajuster le pH= 6,4 ± 0,2 à 25°C
 - ✓ Stériliser par autoclavage à 121° C / 15 min.
- La préparation de PDB est la même, sauf qu'il n'y a pas l'ajout de l'agar. Ajuster pH (6 à 7).

2. Milieu Mueller-Hinton

Le milieu de Mueller-Hinton est recommandé pour tester la sensibilité des microorganismes aux antibiotiques et agents chimio-thérapeutiques.

- ✓ Agar : 17g/l
- ✓ Infusion de bœuf : 300g /l
- ✓ Hydrolysate acide de caséine : 17,5g/l
- ✓ Amidon : 1,5 g/l
- ✓ pH final : 7,3

3. Bouillon nutritif

Composition :

- Bouillon nutritif poudre : 2.3g
- L'eau distillée : 1000ml

Préparation :

- ✓ Mettre 2.3 g de bouillon nutritif dans un bécher, et compléter le volume jusqu'à 100ml.
- ✓ Mettre le tout sur plaque agitateur et agiter jusqu'à homogénéisation.
- ✓ Répartir 10ml dans chaque tube.
- ✓ Autoclavage à 121°C pendant 20min.

4. Gélose nutritive

Composition :

- ✓ Extrait de viande : 1,0 g/L
- ✓ Extrait de levure : 2,5 g/L
- ✓ Peptone : 5,0 g/L
- ✓ Chlorure de sodium : 5,0 g/L
- ✓ Agar-agar : 15,0 g/L
- ✓ pH = 7,0

5. Eau physiologique

- ✓ Eau distillée : 1000ml
- ✓ Chlorure de sodium (Na Cl) : 9g
- ✓ Autoclavage à 121°C pendant 20min.

Annexe 02

1. bactéries test

➤ *Escherichia coli*

E coli est un bacille à Gram négatif appartenant à la famille des *Enterobacteriaceae*, constituant majeur de la flore digestive des mammifères. Classiquement surnommé « colibacille », Cette bactérie est sans aucun doute la bactérie la plus connue et la plus étudiée au monde. (Marie Laure Joly. G ; 2016).

➤ *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa est un fin bacille à Gram négatif aérobie strict qui appartient au domaine des eubactéries, (Mérens. A et al ;2013). *P. aeruginosa*, espèce pigmentée, est de loin l'espèce la plus connue et la plus pathogène du genre *Pseudomonas*, *P. aeruginosa* possède naturellement les mécanismes lui permettant de résister à de nombreux antibiotiques. Cette bactérie opportuniste est caractérisée par son fort potentiel d'adaptation au milieu environnant et par sa rapidité d'acquisition de résistances aux antibiotiques. (Mérens. A et al ; 2011).

➤ *Staphylococcus aureus*

Le *S. aureus* apparaît sous forme de cocci Gram positif, Ce sont des bactéries immobiles, non sporulées, Les colonies sont lisses, opaques, convexes. (Avril et al. 1992)

Il s'agit de germes ubiquitaires, les staphylocoques sont des bactéries commensales de la peau et des muqueuses de l'homme et des animaux (Quinn et al. 2011 ; Nagase et al. 2001).

Toutes les souches de *S. aureus* ont un métabolisme aérobie prédominant et anaérobie facultatif. (Ananthanarayan et Paniker.2006). Les *S. aureus* sont: indole -, acétone +, uréase +, VP +, MR +, réduisant le téllurite de potassium et les nitrates en nitrites, et produisant de l'ammoniac à partir de l'arginine (Freney et al. 1999).

➤ *Bacillus cereus*

B. cereus est une bactérie correspondant à des bacilles à coloration Gram positive. Elles sont assez grandes, 2 à 7 mm de diamètre, (De Vos *et al.*, 2009).

B. cereus est une bactérie capable de produire des spores, lui permettant notamment de résister aux traitements thermiques. *B. cereus* est une bactérie ubiquitaire que l'on retrouve principalement dans les sols. De ce fait, *B. cereus* est retrouvé dans des aliments très variés et représente donc un problème pour l'industrie agro-alimentaire. Les produits céréaliers comme le riz (Lee *et al.*, 1995; Melling *et al.*, 1976; Mortimer and McCann, 1974) ainsi que les fruits et légumes (Stenfors *et al.*, 2008).

2. Activités antibactériennes développées par l'ensemble des isolats sur les bactéries test

1. Technique des cylindres agar :

Les souches fongiques	L'activité antibactérienne de l'isolat, vis-à-vis des quatre bactéries test			
	<i>E. coli</i>	<i>B.subtilus</i>	<i>P.aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>
<i>A. flavus</i>	8 mm	7 mm	17 mm	14 mm
<i>Penicillium sp</i>	5 mm	9 mm	15 mm	10 mm
<i>Alternaria sp</i>	5 mm	5 mm	10 mm	16 mm
<i>Alternaria alternata</i>	5 mm	6 mm	5 mm	6 mm

2. Technique des puits :

Les souches fongiques	L'activité antibactérienne de l'isolat, vis-à-vis des quatre bactéries test			
	<i>E. coli</i>	<i>B.subtilus</i>	<i>P.aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>
<i>A. flavus</i>	11 mm	10 mm	9 mm	11 mm
<i>Penicillium sp</i>	14 mm	13 mm	16 mm	10 mm
<i>Alternaria sp</i>	7 mm	10 mm	11 mm	7 mm
<i>Alternaria alternata</i>	7 mm	11 mm	19 mm	13 mm

3. Technique des disques:

Les souches fongiques	L'activité antibactérienne de l'isolat, vis-à-vis des quatre bactéries test			
	<i>E. coli</i>	<i>B.subtilus</i>	<i>P.aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>
<i>A. flavus</i>	5 mm	5 mm	5 mm	5 mm
<i>Penicillium sp</i>	9 mm	7 mm	10 mm	8 mm
<i>Alternaria sp</i>	5 mm	5 mm	5 mm	6 mm
<i>Alternaria alternata</i>	5 mm	6 mm	5 mm	5 mm

Résumé

L'objectif de ce travail est d'isoler, identifier, et étudier l'activité antibactérienne des différentes souches fongiques obtenues à partir des échantillons prélevés du sol d'une source thermale (hammame Yahia Beni Guecha) à ferdjioua wilaya de mila. Après l'isolement et la purification de ces moisissures sur milieu PDA , une étude macroscopique et microscopique a été effectuée afin d'identifier les souches. Les résultats d'identification ont donné 9 souches fongiques réparties en 4 genres (*Aspergillus*, *Alternaria*, *Penicillium* et *Aureobasidium*).

L'analyse de ces résultats a montré que le genre majoritaire était *Alternaria* avec une fréquence de 45% (4 espèces), suivi du genre *Aspergillus* avec un pourcentage de 33% (3 espèces), et enfin *Penicillium* et *Aureobasidium* avec du même pourcentage de 11%.

La mise en évidence de l'activité antibactérienne des isolats dans le milieu Muller-Hinton a été faite vis-à-vis de quatre souches bactériennes, deux souches Gram négatif *Escherichia coli* *Pseudomonas aeruginosa*, et deux souches Gram positif *Staphylococcus aureus* et *Bacillus cereus* suivant trois techniques ; la technique des cylindres d'agar, la technique des disques et la technique des puits.

Les résultats obtenus montrent que dans la technique des puits : les quatre souches présentent une activité plus ou moins considérable vis-à-vis des quatre bactéries avec une zone d'inhibition entre 7mm à 19mm, dans la technique des cylindres agar : les souches *Aspergillus flavus*, *Penicillium sp*, *Alternaria sp* ont développé une activité antibactérienne considérable avec les deux bactéries *P.aeruginosa*, et *S. aureus* et enfin dans la technique des disques : seulement la souche *Penicillium sp* qui a donné une activité antibactérienne connue avec les quatre bactéries avec une zone de lyse entre 7 mm et 10 mm.

Mots clés : Moisissures, Source thermale, Métabolites secondaires, Bactéries, Activité antibactérienne.

The objective of this work is to isolate, identify, and study the antibacterial activity of different fungal strains obtained from samples taken from the soil of a thermal spring (hammame Yahia Beni Guecha) in ferdjioua wilaya de mila. After the isolation and purification of these molds on PDA medium, a macroscopic and microscopic study was carried out to identify the strains. The identification results gave 9 fungal strains divided into 4 genera (*Aspergillus*, *Alternaria*, *Penicillium* and *Aureobasidium*).

Analysis of these results showed that the majority genus was *Alternaria* with a frequency of 45% (4 species), followed by the genus *Aspergillus* with a percentage of 33% (3 species), and finally *Penicillium* and *Aureobasidium* with the same percentage of 11%.

The demonstration of the antibacterial activity of the isolates in the Muller-Hinton medium was made against four bacterial strains, two Gram negative strains *Escherichia coli* *Pseudomonas aeruginosa*, and two Gram positive strains *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus* following three techniques; the agar cylinder technique, the disc technique and the well technique.

The results obtained show that in the well technique: the four strains exhibit a more or less considerable activity vis-à-vis the four bacteria with an inhibition zone between 7 mm to 19mm, in the agar cylinder technique: the *Aspergillus flavus*, *Penicillium sp*, *Alternaria sp* have developed a considerable antibacterial activity with the two bacteria *P. aeruginosa*, and *S. aureus* and finally in the technique of the discs: only the strain *Penicillium sp* which gave a known antibacterial activity with the four bacteria with a lysis zone between 7 mm and 10 mm.

Keywords: Mold, Hot spring, Secondary metabolites, Bacteria, Antibacterial activity.

الهدف من هذا العمل هو عزل وتحديد ودراسة النشاط المضاد للبكتيريا لمختلف السلالات الفطرية التي تم الحصول عليها من عينات مأخوذة من تربة منبع حراري (حمام يحيى بني قشة) فرجيوة - ولاية ميله.

بعد عزل وتنقية هذه الفطريات على وسط PDA أجريت دراسة مجهريه وميكروسكوبية للتعرف على السلالات. أعطت نتائج التحديد 9 سلالات فطرية مقسمة إلى 4 أجناس (*Aspergillus* و *Alternaria* و *Penicillium* و *Aureobasidium*).

أظهر تحليل هذه النتائج أن غالبية الجنس كان *Alternaria* بنسبة 45% (4 أنواع)، يليه *Aspergillus* بنسبة 33% (3 أنواع)، وأخيراً *Penicillium* و *Aureobasidium* بنفس النسبة 11%.

تم عرض النشاط المضاد للبكتيريا للفطريا المعزولة في وسط Moller-Hinton ضد أربع سلالات بكتيرية هي : تقنية أسطوانات الأجار، تقنية الأقراص وتقنية الآبار. *Bacillus cereus* و *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* باتباع ثلاث تقنيات

تظهر النتائج التي تم الحصول عليها أنه في تقنية الآبار: تُظهر السلالات الأربع نشاطاً كبيراً إلى حد ما مقابل البكتيريا الأربعة مع منطقة تثبيط تتراوح بين 7 مم إلى 19 مم، و في تقنية أسطوانات الأجار: سلالات *Aspergillus flavus*، *Penicillium sp* و *Alternaria sp* أعطت نشاطاً مضاداً للبكتيريا بشكل كبير مع البكتريا *P. aeruginosa* و *S. aureus* وأخيراً في تقنية الأقراص: سلالة *Penicillium sp* هي التي أعطت نشاطاً مضاداً معروفاً للبكتيريا مع البكتيريا الأربعة مع منطقة تحلل بين 7 ملم و 10 ملم.

الكلمات المفتاحية: العفن، منبع حراري، مستقلبات ثانوية، بكتيريا، نشاط مضاد للبكتيريا.

Thème : Etude de l'activité antibactérienne des souches fongiques d'un sol thermal

Nature du diplôme : Master

Domaine : Science de la Nature et de la vie

Filière : Science Biologique

Spécialité : Biochimie et Microbiologie Appliquée

Résumé : L'objectif de ce travail est d'isoler, identifier, et étudier l'activité antibactérienne des différentes souches fongique obtenues à partir des échantillons prélevés du sol d'une source thermale (hammame Yahia Beni Guecha) à ferdjioua wilaya de mila.

Après l'isolement et la purification de ces moisissures sur milieu PDA, une étude macroscopique et microscopique a été effectuée afin d'identifier les souches. Les résultats d'identification ont donné 9 souches fongiques réparties en 4 genres (*Aspergillus*, *Alternaria*, *Penicillium* et *Aureobasidium*).

L'analyses de ces résultats a montré que le genre majoritaire était *Alternaria* avec une fréquence de 45% (4 espèces), suivi du genre *Aspergillus* avec un pourcentage de 33% (3 espèces), et enfin *Penicillium* et *Aureobasidium* avec du même pourcentage de 11%.

La mise en évidence de l'activité antibactérienne des isolats dans le milieu Muller-Hinton a été faite vis-à-vis de quatre souches bactériennes, deux souches Gram négatif *Escherichia coli* *Pseudomonas aeruginosa*, et deux souches Gram positif *Staphylococcus aureus* et *Bacillus cereus* suivants trois technique ; la technique des cylindres'agar, la technique des disques et la technique des puits.

Les résultats obtenus montrent que dans la technique des puits : les quatre souches présentent une activité plus ou moins considérable vis-à-vis les quatre bactéries avec une zone d'inhibition entre 7mm à 19mm, dans la technique des cylindres agar : les souches *Aspergillus flavus*, *Penicilium sp*, *Alternaria sp* ont développé une activité antibactérienne considérable avec les deux bactéries *P. aeruginosa*, et *S. aureus* et enfin dans la technique des disques : seulement la souche *Penicillium sp* qui a donné une activité antibactérienne connue avec les quatre bactéries avec un zone de lyse entre 7 mm et 10 mm.

Mots clés : Moisissures, Source thermale, Métabolites secondaires, Bactéries, Activité antibactérienne.

Lieu de Travail : Laboratoire de biologie centre universitaire Abdelhafid Boussouf Mila.

Dr. Kellab Rabeh	Président	MAA Centre Universitaire de Mila
Dr. Amari bidi salima	Examineur	MAA Centre Universitaire de Mila
Dr. Benseradj Ouafa	Promoteur	MCB Centre Universitaire de Mila
