

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

Ministère de L'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

المدرسة الوطنية العليا لعلوم البحر و تهيئة الساحل

Ecole Nationale Supérieure des Sciences de la Mer et de l'Aménagement du Littoral



Mémoire de fin d'étude en vue d'obtention du diplôme d'Ingénieur et  
Master en Sciences de la Mer

Option : Biotechnologie Marine

**Thème :**

**Criblage des micromycètes marins isolés du port d'Alger  
produisant potentiellement des biosurfactants**

Présenté par :

**HARBADJI Sirine**

**LABAIZ Roumaissa**

Soutenu le 25 octobre 2021, devant le jury composé de :

<b>M BOUAICHA.F</b>	<b>Maître-assistant A</b>	<b>ENSSMAL</b>	<b>Président</b>
<b>Mme BOURABAIN.F</b>	<b>Maître assistante A</b>	<b>ENSSMAL</b>	<b>Promotrice</b>
<b>Mme ALOUACHE.S</b>	<b>Maître de conférence A</b>	<b>ENSSMAL</b>	<b>Examinatrice</b>
<b>Mme BENTCHIKOU.L</b>	<b>Maître-assistant A</b>	<b>ENSSMAL</b>	<b>Examinatrice</b>

Année universitaire 2020-2021

# *Remerciements*

*Nous tenons à remercier tout d'abord le bon dieu le tout puissant pour la force et la patience à terminer ce modeste travail*

*Le présent travail de PFE rentre dans le cadre de la thèse de madame **BOURABAINÉ Fouzia**.*

*Nous tenons à exprimer nos vifs remerciements et notre sincère reconnaissance à notre encadreur **Mme BOURABAINÉ Fouzia** de nous avoir encadré, orienté, aidé et conseillé et surtout pour sa confiance et ses informations enrichissantes tout au long de ce travail.*

*Nous tenons à remercier **Monsieur F.BOUAICHA** le président de jury et nos deux examinatrices **Mme S.ALOUACHE** et **Mme L.BENTCHIKOU** pour l'intérêt qu'ils ont porté à notre recherche en acceptant d'examiner notre travail et de l'enrichir par leurs remarques.*

*Nous tenons à remercier également tout les ingénieurs des laboratoires **LBCMI** et **LG** en particulier **Monsieur N.DJERRAI** et **Mme Houda** pour leur nombreuses aides et soutien moral tout au long de notre période de pratique.*

*Pour conclure, on souhaite adresser mes remerciements à tout l'ensemble des enseignants et du personnel du département des ressources vivantes de l'**ENSSMAL**, aussi tous ceux qui, de près ou de loin, ont contribué à la réalisation de ce travail.*

**Abréviations**

**%** : Pourcentage

**°C** : Degré Celsius

**µl** : microlitres

**µm** : micromètres

**Asp** : *Aspergillus*

**CH<sub>3</sub>OH** : Méthanol

**CHCl<sub>3</sub>** : Chloroforme

**cm** : centimètre

**CMA** : Concentration Minimale Active

**CO<sub>2</sub>** : Dioxyde de carbone

**CuSO<sub>4</sub>** : Sulfate de cuivre

**CYA** : Czapek yeast agar

**CYAL** : Czapek yeast agar liquide

**CYAS** : Czapek Yeast Autolysate agar 5% NaCl

**Cz** : Milieu de Czapek

**ENSSMAL** : Ecole Nationale Supérieure des Sciences de la Mer et l'Aménagement du Littoral

**FeSO<sub>4</sub>** : Sulfate ferreux.

**g** : grammes

**GN25** : milieu gélosé de Nitrate du Glycérol 25%.

**GPYL** : Glucose Peptone Yeast Liquide

**H** : Huile d'olive

**H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>** : Acide sulfurique concentré

**HNO<sub>3</sub>** : Acide nitrique.

**K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>** : Hydrogénophosphate de potassium

**KCl** : Chlorure de potassium.

**L** : Longueur

**l** : largeur

**LBCM** : laboratoire de biologie cellulaire et moléculaire.

**M** : Concentration molaire

**MEA** : Milieu gélosé d'extrait de Malt.

**mg** : Milligrammes.

**MgSO<sub>4</sub>** : Sulfate de Magnésium.

**Min** : Minutes.

**ml** : millilitres.

**N** : Nombre d'essai.

**NaCl** : Chlorure de Sodium

**NaNO<sub>3</sub>** : Nitrate de sodium.

**NaOH** : L'hydroxyde de sodium

**NH<sub>4</sub>2MoO<sub>4</sub>** : Le molybdate d'ammonium

**OSMAC** : One strain many compounds.

**P** : Pétrole.

**PDA** : Milieu gélosé de Dextrose et d'extrait de pomme de terre.

**Pen** : *Penicillium*

**PFE** : Projet de fin d'études.

**pH** : Potentiel d'hydrogène.

**T** : Témoin

**YEPD** : Le peptone dextrose ou extrait de levure

Numéro de figure	Titre	Page
1	Structure de l'hyphe. (A) : hyphe coenocytique, (B) : hyphe cloisonné (LECELLIER, 2013).	8
2	Schématisation de la structure de la paroi fongique (LECELLIER, 2013).	9
3	Schématisation de la reproduction asexuée et sexuée d'une moisissure (LECELLIER, 2013).	10
4	Représentations les plus utilisées pour illustrer les deux parties (hydrophile et hydrophobe) des molécules amphiphiles des surfactants (LARPENT, 2000).	13
5	Filtration de la culture.	28
6	Test de phénol.	29
7	Réactifs utilisés pour le test de phosphate.	30
8	Agitation des tubes.	31
9	Extraction liquide-liquide.	33
10	Incubation de l'ensemble des dilutions au bain marie à 37°C.	34
11	Structure des conidiophores chez le genre <i>Aspergillus</i> (BOTTON et al., 1990).	37
12	<i>Aspergillus fumigatus</i> , (A, B) : Aspect macroscopique sur gélose MEA recto verso de gauche vers la droite respectivement. (C) : Aspect microscopique (x40).	40
13	<i>Aspergillus terreus</i> 3, (A, B) : Aspect macroscopique sur gélose MEA et CYAs de gauche vers la droite respectivement. (C) : Aspect microscopique coloré par le bleu de méthylène (x40).	41
14	<i>Aspergillus melleus</i> 1, (A, B) : Aspect macroscopique sur gélose MEA et CYA de gauche vers la droite respectivement. (C) : Aspect microscopique coloré par le bleu de méthylène (x40).	42
15	<i>Aspergillus ochraceus</i> 1, (A, B, C) : Aspect macroscopique sur gélose CYAs, GN25 et CYA de gauche vers la droite respectivement. (D) : Aspect microscopique (x40).	43
16	Structure des conidiophores chez le genre <i>Penicillium</i> (BOTTON et al., 1990).	44
17	<i>Penicillium roqueforti</i> , (A, B, C) : Aspect macroscopique sur gélose CYAs, PDA et CZ de gauche vers la droite respectivement. (D) : Aspect microscopique (x40).	46
18	<i>Penicillium chrysogenum</i> , (A, B, C) : Aspect macroscopique sur gélose PDA, MEA et CYA de gauche vers la droite respectivement. (D) : Aspect microscopique (x40).	47

<b>19</b>	<i>Penicillium sp5</i> , (A, B) : Aspect macroscopique sur gélose GN 25 et MEA de gauche vers la droite respectivement. (C) : Aspect microscopique coloré par le bleu de méthylène (x40).	<b>48</b>
<b>20</b>	<i>Penicillium sp7</i> , (A, B) : Aspect macroscopique sur gélose PDA et CYAs de gauche vers la droite respectivement. (C) : Aspect microscopique coloré par le bleu de méthylène (x40).	<b>49</b>
<b>21</b>	Aspect macroscopique des souches fongique sur les différents milieux de culture de gauche vers la droite respectivement, (A) : <i>Aspergillus terreus2</i> après 21 jours d'incubation à 25°C sur gélose CYAs, (B) : <i>Aspergillus fumigatus</i> sur gélose Cz, (C) : <i>Aspergillus pseudoglaucus2</i> sur gélose CYA ; et (D) : <i>Penicillium chrysogenum</i> sur gélose PDA, après 7 jours d'incubation.	<b>50</b>
<b>22</b>	Courbe de croissance de <i>Aspergillus terreus2</i> en fonction du milieu de culture.	<b>51</b>
<b>23</b>	Courbe de croissance de <i>Aspergillus fumigatus</i> en fonction du milieu de culture.	<b>51</b>
<b>24</b>	Courbe de croissance de <i>Aspergillus pseudoglaucus2</i> en fonction du milieu de culture.	<b>52</b>
<b>25</b>	Courbe de croissance de <i>Penicillium chrysogenum</i> en fonction du milieu de culture.	<b>52</b>
<b>26</b>	La croissance fongique de <i>Penicillium sp 4</i> sur les différents milieux Cz.T, Cz 1%P et Cz 1%H.	<b>54</b>
<b>27</b>	Courbes représentant l'évolution de la croissance fongique de <i>Penicillium sp 4</i> sur les différents milieux.	<b>55</b>
<b>28</b>	La croissance fongique de <i>Penicillium chrysogenum</i> sur les différents milieux.	<b>56</b>
<b>29</b>	Courbes représentant l'évolution de la croissance fongique de <i>Penicillium chrysogenum</i> sur les différents milieux.	<b>56</b>
<b>30</b>	la croissance fongique de souche <i>Trichoderma sp</i> sur les différents milieux.	<b>57</b>
<b>31</b>	Courbes représentant l'évolution de la croissance fongique de la souche <i>Trichoderma sp</i> sur les différents milieux.	<b>58</b>
<b>32</b>	Résultats du test de phénol.	<b>59</b>
<b>33</b>	Mise en évidence de la production du biosurfactant de type lipopeptide.	<b>60</b>
<b>34</b>	Résultats du test de phosphate.	<b>61</b>
<b>35</b>	Indice d'émulsification des souches étudiées : (A) : avant incubation ; (B) : après 24h d'incubation ; (C) : après 7jours d'incubation.	<b>62</b>
<b>36</b>	Histogramme représentant l'estimation du taux d'émulsion du pétrole après 24 heures.	<b>63</b>
<b>37</b>	Histogramme représentant l'estimation du taux d'emulsion du pétrole après 7 jours d'incubation.	<b>64</b>
<b>38</b>	Test de déplacement d'huile ( <i>Aspergillus ochraceus2</i> )	<b>65</b>

<b>39</b>	Résultat du test de drop collapse de quelques filtrats fongiques.	<b>66</b>
<b>40</b>	Résultats du test de Parafilm.	<b>67</b>
<b>41</b>	Résultats du test d'hémolyse.	<b>67</b>
<b>42</b>	Test de confrontation de quelques souches fongiques.	<b>69</b>

<b>Numéro de tableau</b>	<b>Titre</b>	<b>Page</b>
<b>1</b>	Applications des biosurfactants	<b>15</b>
<b>2</b>	Les références des souches de la mycothèque utilisées dans la présente étude.	<b>20</b>
<b>3</b>	Composition des milieux de culture utilisés ( <b>SAMSON et al., 2004</b> )	<b>23</b>
<b>4</b>	Aspect macroscopique des colonies ( <b>LECELLIER, 2013</b> )	<b>24</b>
<b>5</b>	Composition des milieux de fermentation utilisés ( <b>ZHAO et al., 2018</b> ).	<b>27</b>
<b>6</b>	Caractères macroscopiques et microscopiques des espèces identifiées appartenant au genre <i>Aspergillus</i> .	<b>39</b>
<b>7</b>	Caractères macroscopiques et microscopiques des espèces identifiées appartenant au genre <i>Penicillium</i> .	<b>45</b>
<b>8</b>	Résultats du test d'hémolyse.	<b>68</b>
<b>9</b>	Le diamètre calculé pour le test de confrontation directe.	<b>69</b>

## Sommaire

**Remerciements**

**Abréviations**

**Liste des figures**

**Liste des tableaux**

**Table de matière**

<b>Introduction</b> .....	1
<b>Chapitre I. Synthèses bibliographiques</b> .....	4
I.1 Le peuplement fongique.....	5
I.1.1 les champignons.....	5
I.1.1.1 Définition.....	5
I.1.1.2 Classification des champignons.....	5
I.1.1.2.1 Chytridiomycotina.....	5
I.1.1.2.2 Zygomycotina.....	6
I.1.1.2.3 Ascomycotina.....	6
I.1.1.2.4 Basidiomycotina.....	6
I.1.1.2.5 Deuteromycotina.....	6
I.1.1.3 champignons filamenteux.....	7
I.1.1.3.1 Caractéristiques morphologique .....	7
I.1.1.3.2 Mode de reproduction.....	9
I.1.2 Mycologie marine.....	10
I.1.2.1 Champignons marins microscopiques.....	11
I.1.2.1.1 Définition.....	11
I.1.2.1.2 Répartition géographique.....	11
I.1.2.1.3 Relations biologiques .....	12
A. Saprotrophes.....	12
B. Parasites.....	12
C. La symbiose.....	12

I.1.2.1.4 Applications biotechnologiques.....	13
I.2 Généralités sur les biosurfactants.....	13
I.2.1 Définition.....	13
I.2.2 Classification des biosurfactants.....	14
I.2.3 Microorganismes producteurs.....	15
I.2.4 Utilisation des biosurfactants.....	15
I.3 Dégradation des hydrocarbures par les biosurfactants .....	16
I.3.1 Définition des hydrocarbures.....	16
I.3.2 Classification.....	16
I.3.3 Impacts des hydrocarbures en milieu marin.....	17
I.3.4 La biodégradation des hydrocarbures.....	17
I.3.4.1 Définition.....	17
I.3.4.2 Principe de la biodégradation.....	17
I.3.4.3 Microorganismes aptes à biodégrader les hydrocarbures.....	18
<b>Chapitre II. Matériel et méthodes.....</b>	<b>19</b>
II.1 Matériel biologique.....	20
II.1.1 Les souches sélectionnées pour cette étude.....	20
II.1.1.1 Origine et conservation des souches – LA MYCOTHEQUE- .....	20
II.1.2 Revivification, repiquage et purification.....	21
II.1.3 Identification.....	22
II.1.3.1 Criblage des souches par la culture monosporique OSMAC.....	22
II.1.4 Conservation des souches.....	25
II.2 Suivi de la croissance des souches fongiquesensemencées sur un milieu enrichi de pétrole brut et d'huile d'olive.....	25
II.3 Production de biosurfactant.....	26
II.3.1 Préparation de l'inoculum.....	26
II.4 Tests préliminaires de la production de biosurfactants.....	29
II.4.1 Phénol : la méthode de l'acide sulfurique .....	29
II.4.2 Test de Biuret.....	29

---

II.4.3 Test du phosphate.....	29
II.5 Tests de confirmation de production des biosurfactants.....	30
II.5.1 Détermination de l'index d'émulsion E24.....	30
II.5.2 Test de déplacement d'huile.....	31
II.5.3 Méthode de drop Collapse.....	31
II.5.4 Test de parafilm.....	32
II.6 Sélection des souches toxigènes.....	32
II.6.1 Obtention des extraits .....	32
II.6.1.1 Extraction liquide liquide.....	32
II.6.2 Test d'hémolyse.....	33
II.6.2.1 Hémolyse sur hématies humaines, en petits volumes.....	34
II.7 Méthode de confrontation directe.....	35
<b>Chapitre III. Résultats et discussion</b> .....	<b>36</b>
III.1 Description et illustration des genres étudiés.....	37
III.1.1 Le genre <i>Aspergillus</i> .....	37
III.1.1.1 Structure morphologique.....	37
III.1.1.2 Caractères cultureux généraux.....	38
III.1.1.3 Identification macroscopique et microscopique des isolats du genre <i>Aspergillus</i> .....	38
III.1.1.3.1 <i>Aspergillus fumigatus</i> .....	40
III.1.1.3.2 <i>Aspergillus terreus</i> .....	40
III.1.1.3.3 <i>Aspergillus melleus</i> .....	41
III.1.1.3.4 <i>Aspergillus ochraceus</i> .....	42
III.1.2 Le genre <i>Penicillium</i> .....	43
III.1.2.1 Structure morphologique.....	43
III.1.2.2 Caractères cultureux généraux .....	44
III.1.2.3 Identification macroscopique et microscopique des isolats du genre <i>Penicillium</i> .....	45

III.1.2.3.1 <i>Penicillium roqueforti</i> .....	45
III.1.2.3.2 <i>Penicillium chrysogenum</i> .....	46
III.1.2.3.3 <i>Penicillium sp5</i> .....	48
III.1.2.3.4 <i>Penicillium sp7</i> .....	49
III.2 Suivi de la vitesse de croissance des souches.....	49
III.3 Suivi de la croissance des souches fongiques sur milieu enrichi de pétrole brut et d'huile d'olive.....	53
III.4 Criblage des souches fongiques pour la production de biosurfactant.....	59
III.4.1 Tests préliminaires de la production de biosurfactants.....	59
III.4.1.1 Phénol : la méthode de l'acide sulfurique.....	59
III.4.1.2 Test de Biuret.....	60
III.4.1.3 Test du phosphate.....	60
III.4.2 Tests de confirmation de production des biosurfactants.....	62
III.4.2.1 Indice d'émulsification.....	62
III.4.2.2 Test de déplacement d'huile.....	64
III.4.2.3 Méthode de drop collapse.....	65
III.4.2.4 Test de Parafilm.....	66
III.5 Sélection des souches toxigènes.....	67
III.5.1 Test d'hémolyse.....	67
III.6 Méthode de confrontation directe.....	68
<b>Conclusion et perspectives</b> .....	70
<b>Références bibliographiques</b> .....	73
<b>Annexes</b>	
<b>Résumé</b>	

# *Introduction*

Les champignons sont des composants omniprésents phylogénétiquement et fonctionnellement divers de presque tous les écosystèmes sur terre, y compris les environnements aquatiques. Ils ont été étudiés pour la première fois en 1856 avec la découverte de l'espèce *Sphaeria posidoniae* (*Halothia poidoniae*) associée avec l'herbe marine *Posidonia oceanica* (JONES et al., 2019). Les écosystèmes aquatiques, cependant, restent fréquemment négligés en tant qu'habitats fongiques, bien que les champignons jouent potentiellement un rôle important dans le cycle de la matière organique et la dynamique du réseau trophique. Des améliorations méthodologiques récentes ont facilité une meilleure appréciation de l'importance de la diversité fongique marine, en explorant de nouveaux habitats et en utilisant des techniques modernes principalement les méthodes omiques (GROSSART et al., 2019). C'est ainsi que les champignons marins sont devenus une source importante de métabolites spécialisés utiles pour la découverte de médicaments et un nombre croissant de molécules nouvelles. (BLUNT et al., 2016; 2018).

Les milieux marins sont très précieux car ils abritent des écosystèmes productifs. Ces écosystèmes fournissent des biens (par exemple du poisson consommable, de l'eau et des matières premières) et des services tels que (le tourisme, la lutte contre les inondations et la pollution et les transports) importants pour les humains (BARBIER, 2017). Cependant, les environnements marins sont continuellement altérés sous l'action de différents facteurs de stress, tels que le changement climatique, les perturbations anthropiques et principalement la pollution chimique (CHAPMAN, 2017).

La pollution marine et l'introduction de substances exogènes peuvent affecter la qualité de l'eau, nuire à divers organismes marins et affecter la santé humaine entraînant un dysfonctionnement de la chaîne trophique (BEIRAS, 2018). Les hydrocarbures pétroliers sont considérés aujourd'hui comme l'une des sources de pollution la plus nuisible déversée en milieu marin. Ces dernières années, plusieurs technologies ont vu le jour pour gérer cette contamination (SILVA et al., 2015). Un certain nombre de recherches et de développements sont axés sur l'assainissement des sites contaminés à l'aide de divers agents physiques, chimiques et biologiques. Les biosurfactants représentent une alternative durable de ce processus, car ils sont naturellement synthétisés par des systèmes biologiques tels que les micro-organismes, offrant une toxicité plus faible et une dégradabilité plus élevée (MARCHANT et al., 2018). Bien que les biosurfactants fongiques, ne représentent que 19% du total des biosurfactants produits par les micro-organismes (12% des ascomycètes et 7% des

basidiomycètes) (ABDEL-MAWGOUD *et al.*, 2017; GARAY *et al.*, 2018; SUNDE *et al.*, 2017), l'élimination des contaminants en utilisant ces derniers, a attiré le plus d'attention en raison de leurs capacités naturelles à dégrader le pétrole, de la nature écologique du processus et du fait qu'il n'a aucun effet secondaire à long terme sur l'environnement traité (HOTA *et al.*, 2021).

Le but de cet humble travail est d'identifier et de caractériser des souches fongiques qui ont été isolées du port d'Alger, tout en mettant en évidence leur grand potentiel de production des biosurfactants.

Le contenu et la méthodologie de ce travail sont articulés sur trois chapitres principaux :

- Le **Chapitre 1** est consacré à une étude bibliographique portant sur des généralités sur les champignons en général et sur les micromycètes filamenteux marins, les hydrocarbures et les biosurfactants.
- Le **Chapitre 2** se rapporte aux méthodes expérimentales utilisées pour l'isolement et l'identification des souches fongiques
- Le **Chapitre 3** correspond à l'analyse des résultats expérimentaux obtenus qui répondent à l'objectif principal de notre étude sur la biodégradation des hydrocarbures.

Enfin, l'ensemble des résultats et conclusions seront synthétisés en vue des perspectives qui seront envisagées pour la continuité de cette étude.

***Chapitre I***  
***Synthèses bibliographiques***

## **I.1 Le peuplement fongique**

### **I.1.1 les champignons**

#### **I.1.1.1 Définition**

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 levuriforme (CHABASSE et *al.*, 2002).

Dépourvus de chlorophylle, ils ne peuvent pas, comme les plantes, synthétiser leur matière organique à partir du CO<sub>2</sub> atmosphérique. Ils doivent donc puiser dans le milieu ambiant l'eau et les substances organiques et minérales nécessaires à leurs propres synthèses ; ils sont hétérotrophes (BENMESSAOUD, 2010).

#### **I.1.1.2 Classification des champignons**

La classification des champignons est en constante évolution. Pendant longtemps, elle s'appuie sur celle de Hawksworth, Sutton et Ainsworth (HAWKSWORTH et *al.*, 1995). Fondée sur des caractères morphologiques simples, elle a longtemps fait référence, mais l'étude ultrastructurale, biochimique et génétique a révélé d'importantes différences, nécessitant une réorganisation de la taxinomie (MAAMAR, 2015).

La classification proposée par KWON-CHUNG et *al.* (1992), actualisée par SUTTON et *al.* (1998) et HOOG et *al.* (2000) fait référence aujourd'hui (MAAMAR, 2015).

On différencie quatre divisions selon les modalités de la reproduction sexuée: les Chytridiomycotina, les Zygomycotina, les Ascomycotina et les Basidiomycotina. En outre, lorsque la reproduction sexuée n'est pas connue, la division est appelée Deuteromycotina ou champignons imparfaits (BLACKWELL et *al.*, 1998).

##### **I.1.1.2.1 Chytridiomycotina**

Ce sont les seuls champignons à posséder, des spores uniflagellées (zoospores) (JENNINGS et LYSEK, 1996). Ce sont les champignons les plus anciens (JAMES et *al.*, 2000; JAMES et *al.*, 2006). La présence de spores flagellées semble restreindre ces organismes aux milieux aquatiques et dans les sols humides (JAMES et *al.*, 2000).

Environ 1000 espèces ont été décrites au sein de ce phylum, ce qui correspond à environ 1% des espèces décrites de champignons (TAYLOR et *al.*, 2004).

#### **I.1.1.2.2 Zygomycotina**

Les Zygomycotina constituent un groupe ancien des champignons ayant divergé après les Chytridiomycota (JAMES et *al.*, 2006; BAR-HEN et *al.*, 2008). Plus de 600 espèces ont été décrites à ce jour, ce qui représente moins de 1% des champignons décrits (HAWKSWORTH, 1991; HAWKSWORTH et ROSSMAN, 1997; HAWKSWORTH, 2001). Ils sont caractérisés par un mycélium siphonné et une reproduction asexuée le plus souvent par sporocystospore et une reproduction sexuée par fusion de gamétocyste (BARNETT et BARRY, 1972 ; BOTTON et *al.*, 1990 ; BOUCHET et *al.*, 1999).

#### **I.1.1.2.3 Ascomycotina**

Les Ascomycotina comptent 45000 espèces décrites à ce jour (HAWKSWORTH, 1991 et 2001; TAYLOR et *al.*, 2004). On retrouve également chez ces organismes les champignons utilisés en agroalimentaire (*Saccharomyces cerevisiae*) ou en pharmacologie (*Penicillium chrysogenum*).

Ils présentent une structure caractéristique appelée asque, formé au cours de la reproduction sexuée, qui renferme un nombre défini d'ascospores. Ce sporocyste, globuleux, cylindrique ou plus ou moins claviforme, avec une paroi simple ou double représente un important critère d'identification. Ils sont caractérisés par :

Un mycélium cloisonné ou unicellulaire (levure) ; reproduction asexuée par des conidies; une reproduction sexuée par formation de spore méiotique (ascospores) dans des asques (BOTTON et *al.*, 1990)

#### **I.1.1.2.4 Basidiomycotina**

Les Basidiomycota regroupent 22000 espèces décrites (TAYLOR et *al.*, 2004). Ils sont caractérisés par un mycélium cloisonné ou unicellulaire (levure), une reproduction asexuée par des conidies et sexuée par formation de méiospore (basidiospore) dans des basides (BOTTON et *al.*, 1990).

#### **I.1.1.2.5 Deuteromycotina**

Ce groupe comprend tous les champignons qui ne produisent ni ascospores, ni basidiospores et qui se multiplient au moyen de conidies (BOTTON et *al.*, 1990). Les Deuteromycotina ne constituent pas un groupe naturel, mais d'un ensemble artificiel regroupant environ 15.000 espèces (plus du quart des champignons actuellement connus). Ils sont caractérisés par un

thalle en général cloisonné ou unicellulaire. Ne présentant jamais, ou très exceptionnellement, de forme de reproduction sexuée. La plupart présentent, néanmoins, des affinités d'Ascomycètes. Ils se reproduisent uniquement par voie végétative au moyen de spores asexuées (conidies) ou par simple fragmentation du mycélium (arthroconidie) (BOUCHET et al., 1999).

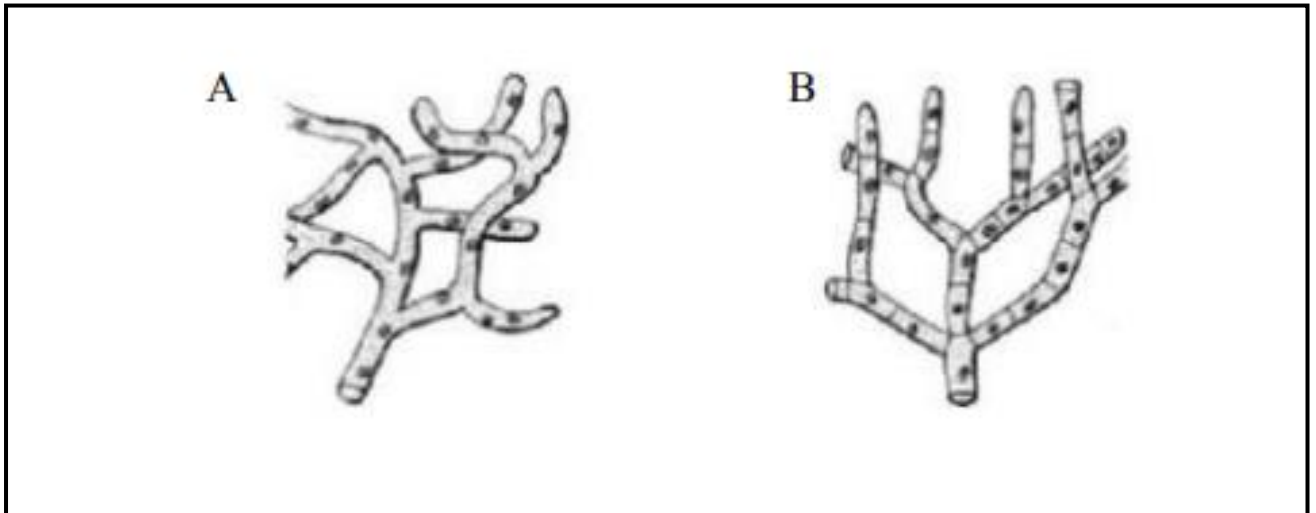
### **I.1.1.3 champignons filamenteux**

Les micromycètes sont des champignons microscopiques regroupant les levures et les champignons filamenteux. Ce sont des microorganismes eucaryotes caractérisés par la présence d'une membrane nucléaire et de mitochondries (LECELLIER, 2013).

Ils sont ubiquitaires et très répandus dans la nature. Les champignons filamenteux sont hétérotrophes, ils sont incapables d'assurer la photosynthèse. Une source de carbone organique est donc nécessaire à leur développement. Ils synthétisent leurs propres nutriments à partir de l'eau et des éléments nutritifs et minéraux qu'ils puisent dans leur environnement. (LECELLIER, 2013).

#### **I.1.1.3.1 Caractéristiques morphologique**

Les champignons filamenteux sont composé d'un appareil végétatif appelé thalle. Il est composé de filaments ou hyphes enchevêtrés les uns par rapport aux autres, et l'ensemble des hyphes constituent un réseau appelé mycélium. Les hyphes sont diffus, tubulaires et fins avec un diamètre compris entre 2 et 15  $\mu\text{m}$  et sont plus ou moins ramifiés. Chez certaines moisissures, comme par exemple *Mucor*, les cellules ne sont pas séparées par une cloison transversale, le thalle est alors dit coenocytique ou « siphonné » alors que chez d'autres, comme par exemple *Aspergillus*, le thalle est cloisonné ou « septé » (Cf. Figure 1- Page 8). Les cloisons, appelées septa possèdent des perforations assurant la communication entre les cellules. Les caractéristiques morphologiques de ces microorganismes sont liées à leur substrat nutritif. La colonisation du substrat est réalisée par extension et ramification des hyphes (LECELLIER, 2013).



**Figure 1:** Structure de l'hyphe. (A) : hyphe coenocytique, (B) : hyphe cloisonné (LECELLIER, 2013).

Les champignons filamenteux possèdent une paroi constituée essentiellement de polysaccharides, de glycoprotéines et de mannoprotéines (Cf. Figure 2-Page 9). Les polysaccharides sont majoritairement la chitine, polymère de molécules de N-acétylglucosamine liées entre elles par une liaison de type  $\beta$ -1,4, et les glucanes, polymères de molécules de D-glucose liées entre elles par des liaisons  $\beta$ . Ces deux polysaccharides assurent la protection des moisissures vis-à-vis des agressions du milieu extérieur. La chitine joue un rôle dans la rigidité de la paroi cellulaire, les glycoprotéines jouent un rôle dans l'adhérence et les mannoprotéines forment une matrice autour de la paroi (LECELLIER, 2013).

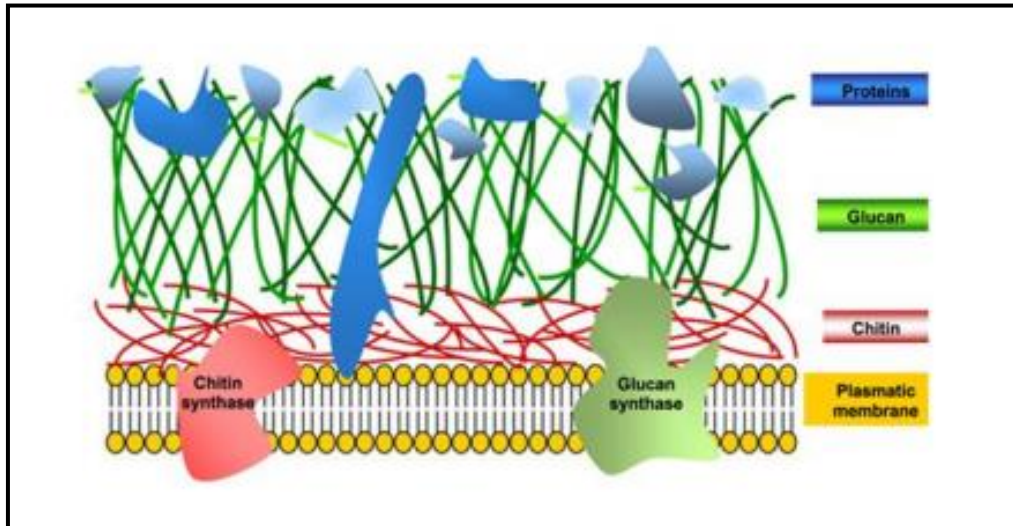
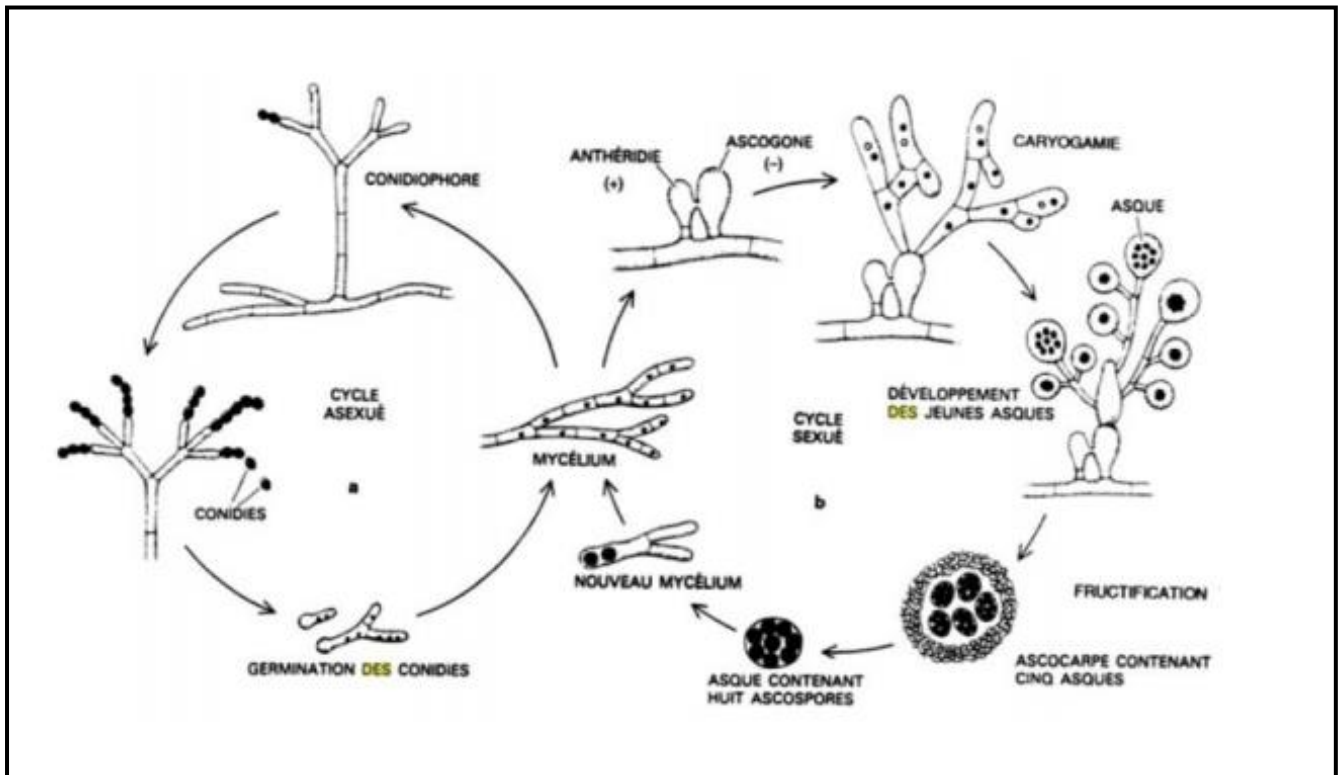


Figure 2: Schématisation de la structure de la paroi fongique (LECELLIER, 2013).

### I.1.1.3.2 Mode de reproduction

Les modalités de la reproduction chez les champignons présentent une très grande variabilité. Leur cycle de vie comprend deux types de reproduction (Cf. Figure 3 – Page 10) :

- **une reproduction asexuée**, au cours de laquelle une spore ou un fragment de mycélium croît et se développe sur un substrat. Le mycélium émet des conidiophores à l'extrémité desquels des conidies sont émises puis disséminées (BOUDIH, 2011).
- **la reproduction sexuée**, implique la rencontre de deux mycéliums de signes sexuels opposés. Un mycélium haploïde va rencontrer un autre mycélium à polarité complémentaire pour donner lieu à la fusion des cytoplasmes, ce qui engendre un nouveau mycélium diploïde. Les cycles de vie diffèrent d'un champignon à un autre selon leur type de spores (BOUDIH, 2011).



**Figure 3:** Schématisation de la reproduction asexuée et sexuée d'une moisissure (LECELLIER, 2013).

### I.1.2 Mycologie marine

Les champignons sont connus pour être présents dans l'environnement marin, où ils jouent un rôle important dans la dégradation des composés organiques (ERIKSSON, 1997). Le champ de la mycologie marine a commencé par trois faits majeurs :

- La description par Desmazières en 1849 de la première espèce de champignon isolé du milieu marin, *Phaeosphira typharum*,
- La découverte des botanistes français Durieu de Maisonneuve et Montagne en 1869 du premier champignon strictement marin, *Halottia posidoniae* (à l'origine *Sphaeria oceanica*),
- L'isolement de levures à partir de la mer par Fischer puis Brebeck en 1894 (BRISOU, 1975).

Cependant, cette discipline n'a pris son véritable essor qu'en 1944, suite à la publication par BARGHOORN et LINDER d'un document de référence intitulé : « Marine fungi, their taxonomy and biology » qui traite de plusieurs espèces fongiques présentes sur le bois en

milieu marin (KOHLMEYER, 1983; GARETH-JONES, 1998 ; VISHWAKIRAN et *al.*, 2001). Depuis, ont été identifiées des centaines d'espèces de micromycètes d'origine marine stricte ou facultative (BENMESSAOUD, 2010).

### **I.1.2.1 Champignons marins microscopiques**

#### **I.1.2.1.1 Définition**

Les champignons marins microscopiques appelés aussi microfunges marines sont des champignons unicellulaires ou filamenteux microscopiques dont les plus grands d'entre eux ne mesurent que quelques millimètres. Leur présence en milieu marin est connue depuis longtemps, le premier spécimen décrit fût découvert en 1869 par C. Durieu de Maisonneuve et JFC. Montagne (KOHLMEYER et KOHLMEYER, 1979).

Les champignons de la mer sont définis selon leurs besoins environnementaux et physiologiques. La définition en vigueur est celle de KOHLMEYER et KOHLMEYER (1979). Elle stipule que « les champignons marins obligatoires sont ceux qui ne peuvent croître et sporuler qu'exclusivement en milieu marin et estuarien. Les champignons marins facultatifs sont ceux provenant de milieux aquatiques et terrestres, capables de se développer, et probablement de sporuler, dans le milieu marin » (FENICAL et JENSEN, 1997).

#### **I.1.2.1.2 Répartition géographique**

La biogéographie de la microfonge marine dépend largement de (KOHLMEYER, 1983; CUOMO et *al.*, 1995 ; HYDE et *al.*, 1998):

- La température
- La salinité
- La teneur en éléments nutritifs
- La pression hydrostatique
- La concentration d'oxygène Présents dans toutes les mers et océans.

Les micromycètes marins sont répartis sur le littoral, les plages sablonneuses, mangroves et les eaux profondes, même dans les profondeurs abyssales à plus de -5000 m (KOHLMEYER, 1977 ; BRISOU, 1975 ; PANG et *al.*, 2004). La microfonge marine des grandes profondeurs reste de ce fait très peu connue (LIBERRA et LINDEQUIST, 1995 ; VISHWAKIRAN et *al.*, 2001). Transportées par des supports inertes ou vivants sur lesquelles elles s'adsorbent, les spores fongiques sont véhiculées par les courants marins (BRISOU, 1975) et atteignent les 5

zones mycogéographiques marines à travers le globe terrestre : arctique, tempérée, subtropicale, tropicale et antarctique (KOHLMEYER, 1983). Leur répartition et fréquence restent plus constantes au niveau des sédiments, sur le plancton côtier et de haute mer, dans les mollusques et intestins de poissons (BRISOU, 1975). Beaucoup de micromycètes marins vivent sur des algues, bois, feuilles et autres corps organiques végétaux et animaux en décomposition, boues, sable et corail (HYDE et *al.*, 1998). Ils sont également présents sur des mollusques, coquillages, crabes et éponges ainsi que dans le tractus gastro-intestinal de poissons et certaines espèces sont d'importants pathogènes en milieu marin. D'autres espèces forment des lichens avec des algues marines sur les rochers côtiers, alors que certaines sont libres et flottent dans le plancton. BOOTH et KENKEL (1986) suggèrent que la température est le facteur le plus important dans la répartition géographique des mycètes marins.

### **I.1.2.1.3 Relations biologiques**

Les micromycètes marins sont des organismes hétérotrophes tout comme leurs homologues terrestres, ils vivent aux dépens de substrats organiques, dont ils tirent l'énergie grâce à un arsenal enzymatique (LIBERRA et LINDEQUIST, 1995). Les relations biologiques des champignons marins avec le monde vivant sont de plusieurs types :

- A. **Saprotrophes:** ils sont activement responsables de la dégradation des substrats ligneux marins riches en ligno celluloses (cellulose, hémicellulose et lignine) (KOHLMEYER et KOHLMEYER, 1995). Ils contribuent également à la dégradation des cadavres animaux marins (SRIDHA et PRASANNARAI, 2001).
- B. **Parasites:** les mycoses ont un impact important dans l'environnement marin et agissent comme un facteur naturel limitant de plantes aquatiques, d'algues et d'animaux (intestins de Poissons et Crustacés). Ils provoquent de sérieuses infections chez les invertébrés marins, et affectent le développement des œufs et des larves de crustacés. Les champignons mitosporiques sont les mycopathogènes marins les plus fréquents (*Fusarium sp.* chez les Crustacés, *Cladosporium sp.* chez le poulpe, *Phialospora sp.* infections internes chez les Poissons, *Ichthyophonus sp.* Inflammation par enkystement des muscles de Poissons) (POLGLASE et *al.*, 1986).
- C. **La symbiose :** elles forment un lichen (ex. *Chadefaudia corallinarum* s'associe avec l'algue *Dermatoliton sp.*) ou une mycophycobiose (relation d'intérêt mutuel entre un champignon et une macroalgue) démontrée par la relation obligatoire et protectrice pour l'algue entre *Turgidosculum complicatum* et la macroalgue *Praseola borealis* (KOHLMEYER et KOHLMEYER, 1979; STANLEY, 1992; HYDE et *al.*, 1998).

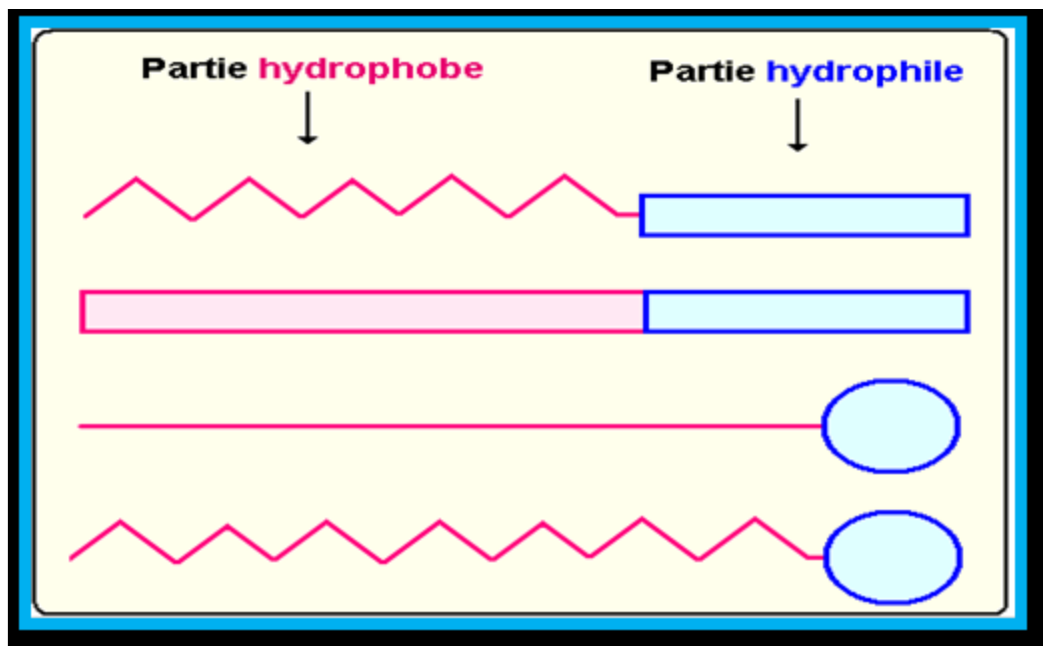
#### **I.1.2.1.4 Applications biotechnologiques**

Les champignons sont des sources importantes de métabolites actifs et de nouvelles structures chimiques, qui peuvent être utilisés en pharmacologie ou dans les processus industriels (IMHOFF et *al.*, 2011). Et les champignons marins en particulier sont d'un grand intérêt puisqu'ils ont le potentiel d'apporter une nouvelle diversité biosynthétique (BUGNI et IRELAND, 2004). Il a également été montré que certains champignons pourraient être utilisés en bioremediation pour leur activité enzymatique liée à la dégradation de la lignine (HYDE et *al.*, 1998 ; RAGHUKUMAR, 2000). Des études sont consacrées sur leur capacité à casser les hydrocarbures, ce qui pourrait être exploité pour dégrader les nappes de pétroles d'origine accidentelle (JONES, 2011).

### **I.2 Généralités sur les biosurfactants**

#### **I.2.1 Définition**

Les biosurfactants sont des molécules amphiphiles constituées d'une partie hydrophile polaire et d'une partie hydrophobe non polaire (Cf. Figure 4). Généralement, le groupement hydrophile est constitué d'acides aminés, peptides ou de polysaccharides (mono ou di) ; le groupement hydrophobe est constituée d'acides gras saturés ou non saturés (DESAI et BANAT, 1997).



**Figure 4 :** Représentations les plus utilisées pour illustrer les deux parties (hydrophile et hydrophobe) des molécules amphiphiles des surfactants (LARPENT, 2000).

La portion hydrophile de la molécule permet de distinguer quatre types chimiques de biosurfactant:

- les cationiques qui possèdent une charge positive ;
- les anioniques, agents de surface possédant un ou plusieurs groupes fonctionnels s'ionisant en solution aqueuse pour donner des ions chargés négativement ;
- les non ioniques, sans charge ;
- les amphotères (zwitterioniques) qui possèdent deux groupements hydrophiles différents: l'un anionique et l'autre cationique. Selon le pH de la solution, ils peuvent agir en tant qu'espèce anionique, cationique ou neutre (WEST et HARWELL, 1992).

La portion hydrophobe, quant à elle, influe sur la chimie du biosurfactant par son aromaticité, son nombre de carbones ou son degré de ramification (WEST et HARWELL, 1992).

### **I.2.2 Classification des biosurfactants**

Les biosurfactants sont classés suivant la nature biochimique du surfactant produit par le micro-organisme. On distingue cinq grandes classes de biosurfactants : les glycolipides, les lipopeptides, les phospholipides, les liposaccharides et les lipides neutres (HEALY et *al.*, 1996).

**Les glycolipides** : sont constitués d'hydrates de carbone en combinaison avec une longue chaîne d'acides aliphatiques ou d'acides hydroxyaliphatiques. Les glycolipides les plus étudiés sont les rhamnolipides, les tréhalolipides et les sophorolipides (RON et ROSENBERG, 2002).

**Les lipopeptides** : sont composés d'un lipide attaché à une chaîne polypeptidique. Les Lipides d'ornithine sont les plus connus (HEALY et *al.*, 1996).

**Les phospholipides** : sont formés de groupements alcool et phosphate et de chaîne lipidique. BOGNOLO (1999) indique que bien que présents dans tous les micro-organismes, il y a peu d'exemples de production extracellulaire.

**Les lipopolysaccharides** ou **polymériques** : sont constitués d'une ou plusieurs unités saccharides et d'acides gras (HEALY et *al.*, 1996).

**Les acides gras et lipides neutres** : sont les biosurfactants qui possèdent la masse molaire la plus élevée (HEALY et *al.*, 1996).

### **I.2.3 Microorganismes producteurs**

Les biosurfactants sont principalement produits par des microorganismes se développant de manière aérobie, en utilisant une ou plusieurs sources de carbone, comme les hydrates de carbone, des huiles ou des hydrocarbures. Ces microorganismes sont en général des levures, des champignons ou des bactéries. Le principal rôle physiologique du biosurfactant est de permettre aux microorganismes de se développer sur des substrats insolubles en réduisant la tension interfaciale entre l'eau et le substrat, rendant ce dernier plus facilement accessible aux cellules (MATA-SANDOVAL *et al.*, 2000).

### **I.2.4 Utilisation des biosurfactants**

Les biosurfactants sont reconnus pour être non toxiques, biodégradables et peuvent être utilisés dans des conditions extrêmes (BANAT *et al.*, 2000). L'utilisation des biosurfactants est résumé dans le tableau ci-dessous :

**Tableau 1:** Applications des biosurfactants

<b>Le champ d'application</b>	<b>Les applications</b>
<b>Agriculture</b>	Le biosurfactant peut fournir un soutien par : amélioration de sol, la protection contre la phytopathogène, et la stimulation de l'absorption des engrais foliaires (RENFRO <i>et al.</i> , 2014) (LIU <i>et al.</i> , 2016)
<b>Agroalimentaire</b>	Amélioration de la texture et de la saveur des aliments (ABOUSEOUD , 2008)
<b>Chimique</b>	Comme détergent domestique et industriel grâce à leurs propriétés intrinsèques émulsifiantes (MUKHERJEE <i>et al.</i> , 2010) (SEKHON RANDHAWA <i>et al.</i> , 2014)
<b>Cosmétique</b>	Péparation de crème hydratante, préparation de shampoings et savons riches en huiles essentielles (ABOUSEOUD , 2008)
<b>Médical</b>	Ils ont un effet thérapeutique grâce à leur activité cellulaire anti-tumorale (GUDINA <i>et al.</i> , 2013) Dans l'industrie pharmaceutique, comme agents thérapeutiques présentant des activités antibactériennes, antifongiques et antivirales pour combattre les différentes maladies infectieuses (GUERGUORI, 2010)

<b>Environnemental</b>	Accumulation des hydrocarbures pétroliers, des métaux lourds et d'autres polluants (SOUZA <i>et al.</i> , 2014)
------------------------	---

### **I.3 Biodégradation des hydrocarbures par les biosurfactants**

#### **I.3.1 Définition des hydrocarbures**

Un hydrocarbure est un composé organique contenant des atomes de carbone (C) et d'hydrogène (H) (HEIDER *et al.*, 1999), où le carbone présente 83 à 87% en volume et l'hydrogène 10 à 14% (DUROUSSET, 1999). Les hydrocarbures peuvent aussi comprendre des atomes d'oxygène, d'azote et de soufre (LEFEBVRE, 1986) et des métaux à l'état de traces (nickel, vanadium, etc.) (BASTIEN-VENTURA *et al.*, 2005).

#### **I.3.2 Classification**

Les hydrocarbures constituent la fraction la plus importante d'un brut pétrolier, ils représentent entre 65 et 95% de la plupart des pétroles bruts. Ces hydrocarbures peuvent être regroupés en quatre familles principales qui sont présentes en proportions variables selon leur origine : les hydrocarbures saturés (20 à 70%), les hydrocarbures aromatiques et poly aromatiques (20 à 40%), les composés polaires (5 à 25%) et les asphaltènes (0 à 10%) (SYAKTI, 2004).

- **Hydrocarbures saturés :** Parmi les hydrocarbures saturés on distingue les alcanes linéaires, les alcanes ramifiés et les cycloalcanes.
- **Hydrocarbures aromatiques :** les hydrocarbures aromatiques sont moins abondants que les alcanes, et ne représentent que 10 à 30 % des hydrocarbures totaux d'un brut pétrolier.
- **Composés polaires**  
Les composés polaires correspondent à des molécules hétérocycliques, telle que :
  - Des composés oxygénés : phénols, acides carboxyliques, alcools, aldéhydes, ...etc.
  - Des composés soufrés : mercaptans, sulfures, disulfures, ...etc.
  - Des composés azotés : pyridines, quinoléines, ...etc.
- **Asphaltènes :** Les asphaltènes correspondent à une classe de composés de hauts poids moléculaires, insolubles dans le pentane ou l'hexane. La structure de ces composés est mal connue du fait, d'une part de leur composition chimique complexe, et d'autre part de méthodes analytiques difficilement utilisables.

### **I.3.3 Impacts des hydrocarbures en milieu marin**

Les effets des hydrocarbures sur les organismes et les écosystèmes marins sont divers. Lorsqu'ils sont déversés en grande quantité, les hydrocarbures forment un film à la surface de l'eau qui interfère avec la pénétration de la lumière dans la colonne d'eau ainsi qu'avec les échanges gazeux entre l'air et l'eau. Ils sont aussi connus pour avoir un effet inhibiteur sur de nombreuses réactions enzymatiques et peuvent obstruer les ouvertures stomatiques chez les macrophytes interférant ainsi avec les processus de photosynthèse (KAISER, 2001). D'autres études effectuées dans la mer du Nord ont démontré que la pollution par les hydrocarbures diminue la richesse spécifique et nuit à la dispersion des organismes marins (WARWICK, 2004).

Les hydrocarbures représentent une importante source de pollution des eaux et des océans. Cette pollution induit une contamination des écosystèmes marins par les rejets industriels et la composition des produits pétroliers (TERMOUL, 2015).

### **I.3.4 La biodégradation des hydrocarbures**

L'utilisation de méthodes biologiques dans la dépollution des zones contaminées par les hydrocarbures se basant sur le phénomène de la biodégradation par les microorganismes appelés hydrocarbonoclastes.

#### **I.3.4.1 Définition**

La biodégradation est l'ensemble des mécanismes de transformation d'un contaminant en différents sous produits par l'action des microorganismes. Ce phénomène peut s'effectuer à n'importe quel milieu (sol, eau) ainsi que dans différentes phases du polluant (liquide, solide, gazeuse) (LECOMTE, 1995).

#### **I.3.4.2 Principe de la biodégradation**

La biodégradation est un phénomène naturel. Elle est le résultat de la dégradation de molécules organiques par les microorganismes (bactéries, champignons...) dont la croissance s'effectue par l'oxydation du carbone qui est utilisé comme source d'énergie. Cette réaction met en jeu deux autres éléments, l'azote et le phosphore, qui participent à la synthèse protéique ; lorsque l'oxydant est représenté par l'oxygène, on parle de condition d'aérobiose. Dans le cas d'anaérobiose, l'oxygène est remplacé par les nitrates, sulfates ou méthane (JOSE, 1999).

#### **I.3.4.3 Microorganismes aptes à biodégrader les hydrocarbures**

Les champignons ont la double particularité de posséder une grande capacité à se propager et des équipements enzymatiques capables de dégrader un large spectre de molécules polluantes (CERNIGLIA, 1992). La capacité de se développer sur les hydrocarbures ne se limite pas uniquement aux bactéries, certains sites contaminés contiennent également de nombreux champignons et levures capables de les dégrader (KLUG et MARKOVETZ, 1971; BLASIG et *al.*, 1984; MEULENBERG et *al.*, 1997; YAMADA-ONODERA et *al.*, 2002).

Les champignons peuvent transformer les hydrocarbures de façon cométabolique en métabolites moins toxiques par l'action de peroxydases et de monooxygénase.

Parmi les micromycètes les plus actifs dans la dégradation des produits pétroliers, ceux appartenant aux genres *Aspergillus*, *Penicillium*, *Acremonium*, *Trichoderma*, *Gongronella* et *Fusarium* (CAO et *al.*, 2009; CHAINEAU et *al.*, 1995; LEAHY et COLWELL, 1990) ; *Mucor*, *Rhodotorula*, *Candida* et *Sporobolomyces* (ATLAS et BARTHA, 1992; SARKHOH et *al.*, 1990), ainsi que *Absidia fusca* (VILLEMAIN et *al.*, 2006).

L'utilisation de champignons d'origine marine dans la bioremédiation des milieux salins pollués est facilitée par leur tolérance à la salinité.

# *Chapitre II*

## *Matériel et méthodes*

## II.1 Matériel biologique

### II.1.1 Les souches sélectionnées pour cette étude

#### II.1.1.1 Origine et conservation des souches – LA MYCOTHEQUE-

Les souches fongiques sélectionnées pour cette étude font partie de la collection 2018-2020 conservées dans la mycothèque propre à Mme Fouzia BOURABAINÉ. Les isolats ont été énumérées au niveau du port d'Alger, à partir du sédiment profond (de 9 à 20mètres), de l'eau de mer, de débris et d'organismes marins (moules, oursins) (Cf. Tableau 2). Ces derniers ont fait l'objet de mettre en évidence la possibilité à la découverte de nouvelles souches productrices de substances à rendements bénéfiques dans le domaine biotechnologique.

**Tableau 2:** Les références des souches de la mycothèque utilisées dans la présente étude.

<b>Codes des souches</b>	<b>Références</b>	<b>Date de prélèvement</b>	<b>Lieu de prélèvement</b>	<b>Matrice</b>
1	003.23.09.20.Q12/A2	03mars2020	Port d'Alger	Eau de mer
2	010.C2 PDA	03mars2020	Port d'Alger	Sédiment
3	S35-36CZ.012.07.03 MEA	03mars2020	Port d'Alger	Corde
4	009.23.09/A2/15.04.2021 MEA	03mars2020	Port d'Alger	Sédiment
5	AG002.13 09 112 PDA	03mars2020	Port d'Alger	Polystere
6	Q12006.10.2020 MEA	03mars2020	Port d'Alger	Eau de mer
7	MEA-1 14 SA05/ blanc PDA	Avril 2018	Port d'Alger	Vase noire
8	S33-34.043.20/035 23.09.PDA	03mars2020	Port d'Alger	Vase noire
9	009.23.09 A1 MEA	03mars2020	Port d'Alger	Sédiment
10	Bois 007.07 PDA	03mars2020	Port d'Alger	Bois
11	S 33-34 /-2/ MEA	03mars2020	Port d'Alger	Vase noire
12	MS-37/03/03 (ATM) MEA	03mars2020	Port d'Alger	Vase noire
13	15/04/004.03.20 MEA	03mars2020	Port d'Alger	Polystere
14	010.23.09. PDA	03mars2020	Port d'Alger	Bois
15	015/23.09.2020	03mars2020	Port d'Alger	Moule

16	OP.010055.12.03/09.2	03mars2020	Port d'Alger	Oursin
17	015.07-03 MEA	03mars2020	Port d'Alger	Sédiment
18	F3-010/004- F2/F9	Avril 2018	Port d'Alger	Sédiment
19	ZC/H4 -19/05 PDA	Avril 2018	Port d'Alger	Vase noire
20	S26-1.03.03 PDA	03mars2020	Port d'Alger	Vase noire
21	016.23.09 Rose 28.09.20 PDA	03mars2020	Port d'Alger	Eau de mer
22	003 I9/H4-009	Avril 2018	Port d'Alger	Sédiment
23	OPSM2 j .002.07.03 PDA	Avril 2018	Port d'Alger	Oursin
24	009-F1/003-G6 MEA	Avril 2018	Port d'Alger	Vase noire putride
25	009-G1 /Asp Tam MEA/	Avril2018	Port d'Alger	Eau de mer
26	MP.B/011.07.03/ A1 PDA	Avril 2018	Port d'Alger	Moule
27	S35.36 CZ 012.01.03 PDA	03mars2020	Port d'Alger	Vase noire
28	056.26.09. MEA	03mars2020	Port d'Alger	Eau de mer
29	23-05 CYA 37°C/ 009 F2 MEA	Avril 2018	Port d'Alger	Sédiment
30	015-1J/028.03- 03/8Nov2020MEA	03mars2020	Port d'Alger	Sédiment
31	S36-1/MEA 035- 08.03/09.20 PDA	03mars2020	Port d'Alger	Vase noire
32	S35 34 03.03-2 MEA	03mars2020	Port d'Alger	Vase noire
33	T/004F1/25.02.20 MEA	Avril 2018	Port d'Alger	Eau de mer
34	F6 MEA	Avril2018	Port d'Alger	Eau de mer
35	009F2-2018/5PDA/Sj	Avril2018	Port d'Alger	Sédiment
36	009 F1 PDA	Avril2018	Port d'Alger	Vase noire
37	At.003-I8/H3	Avril2018	Port d'Alger	Vase noire
38	010 F2/F8 (004)	Avril2018	Port d'Alger	Sédiment
39	POLYEST 03.03	03mars2020	Port d'Alger	Polystere
40	010.C1/18	Avril2018	Port d'Alger	Eau de mer
41	004 S2/ I6 MEA	Avril2018	Port d'Alger	Sédiment
42	010 F1/004 F8 PDA	Avril2018	Port d'Alger	Eau de mer
43	010-E2 /18/	Avril2018	Port d'Alger	Vase noire

44	009 E9 / MUC MEA	Avril2018	Port d'Alger	Vase noire
45	010 F2/ 004F9 MEA+PDA	Avril2018	Port d'Alger	Eau de mer
46	008.07.03	03mars2020	Port d'Alger	Vase noire
47	004F2/ E3 010 MEA	Avril2018	Port d'Alger	Eau de mer
48	S36-1/P035/07.03	03mars2020	Port d'Alger	Vase noire
49	003 I9/009 H4	Avril2018	Port d'Alger	Vase noire

### **II.1.2 Revivification, repiquage et purification**

La purification des souches se fait par une série de repiquage qui consiste à transférer aseptiquement un microorganisme dans un milieu neuf et stérile pour le maintenir en culture pure (BOTTON et *al.*, 1990).

Le repiquage du contenu des eppendorfs et des boîtes de Pétri conservé entre 2018 et 2020 au niveau du laboratoire LBCM1 de L'ENSSMAL a été fait afin de revivifier les colonies.

Dans des conditions aseptiques et afin de limiter au maximum les risques de contamination, le repiquage de chaque colonie a été effectué sur les milieux PDA (49g de PDA déshydraté ; 1000ml d'eau de mer stérile) et/ou MEA ( extrait de malt : 20g ; peptone : 1g ; glucose : 20g ; Agar : 22g ; eau de mer stérile : 1000ml) coulés dans des boîtes de Pétri de 9 cm de diamètre, en prélevant un fragment de la colonie à l'aide d'une aiguille stérile et fine et on le dépose au centre de la boîte de Pétri bien identifiée.

Les boîtes de Pétri sont incubées à  $25 \pm 2$  °C (qui est une température optimale de croissance pour un grand nombre de moisissures) jusqu'à l'obtention de souches pures.

### **II.1.3 Identification**

L'identification des champignons filamenteux repose essentiellement sur l'analyse des caractères morphologiques, macroscopiques et microscopiques. Ces méthodes d'identification peuvent être complétées par une analyse moléculaire (LECELLIER, 2013).

#### **II.1.3.1 Criblage des souches par la culture monosporique OSMAC**

Les souches fongiques sélectionnées pour ce test sont référenciées de 1 à 34 présentes dans le tableau 2 page 20-21.

Des petits carrés de gélose de 0,5 sur 0,5 cm sont découpés à partir d'une gélose sur boîte de Pétri contenant à sa surface une culture fongique purifiée et sont mis dans des eppendorfs contenant un mélange d'eau de mer stérile et de tween 80 à 0.05%, puis bien homogénéiser au vortex.

La méthode consiste à inoculer le mélange préparé dans des boîtes de Pétri coulées avec différents milieux de culture à savoir (PDA, MEA, CYA, CYAs, Czapek, et GN25) (Cf. Tableau 3- Page 23-24) en trois points à l'aide d'une fine aiguille stérile. Les boîtes de PDA, MEA, CYA, CYAs, Czapek, et GN25 sont incubées à  $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , avec des boîtes supplémentaires de CYA incubées à  $37^{\circ}\text{C}$  pendant 7 jours.

A fin de déterminer la vitesse de croissance des souches fongiques sur les différents milieux de culture, la mesure de la taille des colonies (longueur, largeur) a été pris en considération chaque jour jusqu'à 21 jours.

**Tableau 3:** Composition des milieux de culture utilisés (SAMSON *et al.*, 2004)

Composition	Milieux de culture						Cz concentré	Elément trace
	PDA	MEA	CYA	CYAs	Czapek	GN25		
<b>Glucose (g)</b>		20						
<b>Saccharose (g)</b>			30	30	30			
<b>Peptone (g)</b>		1						
<b>Extrait de levure (g)</b>		20	5			3,7		
<b>Extrait de malt (g)</b>				5				
<b>PDA déshydraté (g)</b>	49							
<b>KCl (g)</b>							5	
<b>K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (g)</b>			1	1	1			
<b>NaNO<sub>3</sub> (g)</b>							30	
<b>CuSO<sub>4</sub>, 5H<sub>2</sub>O (g)</b>							0,05	0,5
<b>FeSO<sub>4</sub>, 7H<sub>2</sub>O (g)</b>							0,1	
<b>MgSO<sub>4</sub>, 7H<sub>2</sub>O (g)</b>							5	

ZnSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O (g)					0,1	0,1
Na Cl (g)			50			
Glycérol (ml)					198	
Cz concentré (ml)	10	10	10		750	
Elément trace (ml)			1			
Agar (g)	22	15	20	15	15	
Eau distillée QSP (ml)					1000	100
Eau de mer stérile QSP (ml)	1000	990	1000	1000		

- **Analyse macroscopique**

Le suivi macroscopique a été effectué à l'œil nu mais aussi en utilisant une loupe binoculaire. D'après LECÉLLIER (2013), lors de l'analyse macroscopique des colonies obtenues après incubation des champignons filamenteux, plusieurs aspects de l'appareil végétatif sont observés et enregistrés dans le tableau 4 :

**Tableau 4:** Aspect macroscopique des colonies (LECELLIER, 2013)

<b>Aspect de l'appareil végétatif</b>	duveteux, laineux, cotonneux, velouté, poudreux, granuleux ou glabre.
<b>Le relief</b>	plat, plissé ou cérébriforme.
<b>La taille</b>	petite, étendue ou envahissante.
<b>La couleur</b>	blanche, crème ou colorée (verte, brune, orangée, violette, grises...).

La présence d'un pigment diffusant dans la gélose ainsi que certains paramètres telle que la vitesse de la pousse des colonies ou la température de développement peuvent être de bons indicateurs pour l'identification d'une moisissure.

- **Analyse microscopique**

Les caractéristiques microscopiques s'articulent autour de la couleur et la longueur des têtes conidiales, du conidiophore, la forme et la sériation des vésicules, la taille, la forme et la rugosité des conidies et la longueur et la largeur des phialides.

Les lames ont été préparées, en ajoutant de l'acide lactique à 60% ou le Rouge Congo, ensuite observées au microscope (10x et 40x) puis identifiées.

#### **II.1.4 Conservation des souches**

Pour un usage ultérieur des souches fongiques identifiées, trois techniques de conservation ont été utilisées :

**A.** Conservation à 4 °C dans des eppendorfs contenant un mélange d'eau de mer et de tween 80.

**B.** Conservation à température ambiante dans des eppendorfs contenant un mélange d'eau de mer et de tween 80

**C.** Conservation de très longue durée en cultures congelées (congélation à -20°C) dans des eppendorfs contenant un mélange d'un milieu liquide (CYA) et 30 % de glycérol.

#### **II.2 Suivi de la croissance des souches fongiquesensemencées sur un milieu enrichi de pétrole brut et d'huile d'olive**

Les souches fongiques sélectionnées pour ce test sont présentes dans le tableau 2 page 20, référenciées comme suivant : 1, 3, 4, 5, 6, 16, 21, 22, 26, 27, 29, 31, 32, plus les souches référenciées de 35 à 49.

Les isolats fongiques ont été ensemencés selon MAAMAR et *al* (2020), dans un milieu Czapeck contenant : 3 g/L de NaNO<sub>3</sub>; 1 g/L de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,5 g/L de MgSO<sub>4</sub> ; 0,5 g/L de KCl ; 0,01 g/L de FeSO<sub>4</sub>; 18 g/L d'Agar et 3% sels minéraux. Toutes ces substances sont dissoutes dans un litre d'eau de mer stérile, pour se rapprocher des conditions marines.

Le milieu de culture est stérilisé à l'autoclave à 120°C pendant 20 min et pour inhiber toute prolifération bactérienne, 50mg/ml de Clamoxyl est incorporé à ce milieu puis complété avec 1% de pétrole brut (1%P) comme seul source de carbone.

Un autre flacon contenant le même milieu est complété avec 1% d'huile d'olive (1%H) comme seul source de carbone.

Un témoin dans lequel 1% de pétrole brut et de l'huile d'olive ont été remplacés par 1% de saccharose ; c'est le milieu Czapek témoin (Cz.T).

Une bouture de chaque colonie a été mis dans des boîtes de Pétri contenant les différents milieux préparés: Cz.T, Cz 1%P et Cz 1%H avec n=2 (deux essais ont été réalisés pour chaque souche et pour un seul milieu).

Les boîtes de Pétri ont été incubées à 25°C pendant huit à dix jours. Un suivi de la taille radiale de la colonie a été effectué chaque 48h.

### **II.3 Production de biosurfactant**

#### **II.3.1 Préparation de l'inoculum**

Vingt neuf (29) souches ont été sélectionnées pour tester la production du biosurfactant.

Pour la préculture et dans les conditions aseptiques, 5 disques de chaque souche ont été prélevés à l'aide d'un cône stérile de 6mm à partir d'une culture en plein sporulation (de 9 à 11 jours d'incubation), puis ont été introduits dans des flacons contenant 100ml du bouillon autoclavé CYAL (Cf.Tableau 5- Page 27). Les flacons ont été incubés à 25°C pendant 72h, avec une agitation chaque 24h.

Après 72h, le contenu des flacons a été versé dans d'autres flacons contenant 100ml du bouillon autoclavé GPYL (Cf.Tableau 5- Page 27), puis ont été incubés à 25°C pendant 12jours, avec une agitation chaque 24h.

**Tableau 5:** Composition des milieux de fermentation utilisés (ZHAO *et al.*, 2018).

Composition	Milieux de culture	
	CYAL	GPYL
Glucose (g)		20
Sucrose (g)	30	
Extrait de levure (g)	5	7
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (g)	1	1
MgSO <sub>4</sub> (g)		0,5
NaCl (g)		5
CaCO <sub>3</sub> (g)		2
Tryptone (g)		3
Cz concentré (ml)	10	
Eau de mer stérile QSP(ml)	990	1000

Après incubation, la culture a été stoppée par une double filtration à l'aide d'une compresse stérile et une membrane de filtration de 0,45 µm (Cf.Figure 5- Page 28). Les filtrats fongiques ont été récupérés dans des flacons et centrifugés à 2500 tours pendant 15 minutes; les surnageants ont été récupérés dans des bocaux stériles et conservés à 4°C. Le culot, la compresse stérile et la membrane de filtration utilisés pour la filtration contenant les débris du mycélium ont été séchés, pesés et conservés pour des études ultérieures.



**Figure 5** : Filtration de la culture.

## II.4 Tests préliminaires de la production de biosurfactants

### II.4.1 Phénol : la méthode de l'acide sulfurique

Un millilitre du filtrat a été ajouté à un millilitre du phénol à 5%. Ensuite, 2 à 5 ml de l'acide sulfurique concentré ont été ajoutés goutte à goutte (Cf. Figure 6), jusqu'à l'apparition d'une couleur orange indiquant la présence des **glycolipides** contenant les biosurfactants (REVATHI SUCHMA et al., 2018).

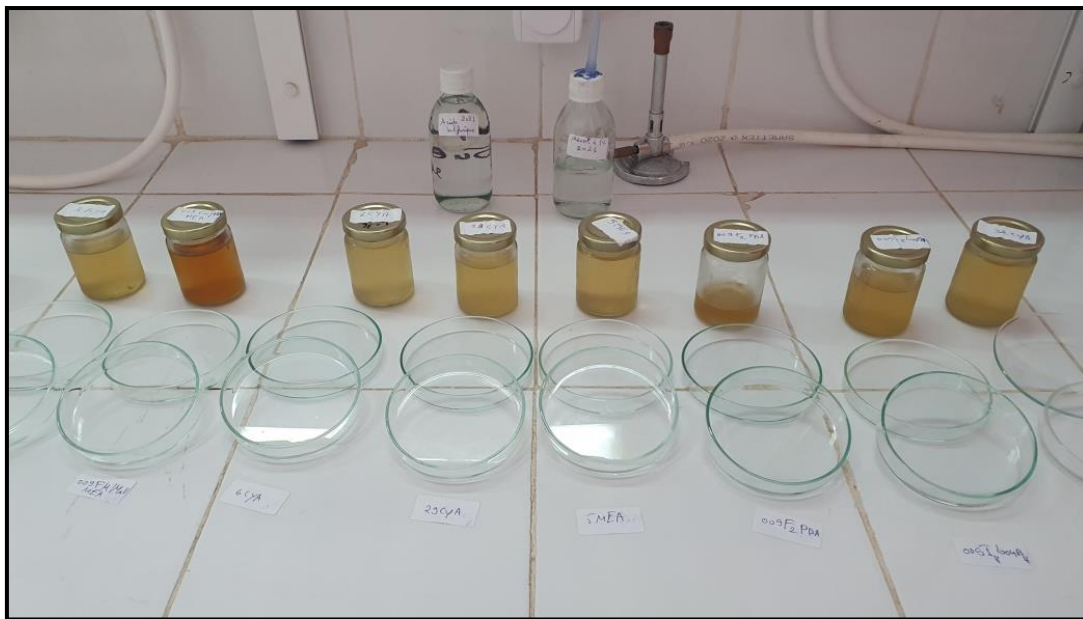


Figure 6 : Test de phénol.

### II.4.2 Test de Biuret

Deux millilitres du filtrat ont été chauffés à 70°C pendant 10 minutes. Ensuite, 10 gouttes de NaOH à 1M ont été ajoutées à ce mélange. 1% de sulfate de cuivre a été ajouté goutte à goutte, jusqu'à l'apparition d'une couleur violet ou rose indiquant la présence des **lipopeptides** (REVATHI SUCHMA et al., 2018).

### II.4.3 Test du phosphate

A deux millilitres du filtrat sont ajoutés 10 gouttes de l'acide nitrique HNO<sub>3</sub> puis chauffer à 70°C pendant 10 min. ensuite, le molybdate d'ammonium à 5% est ajouté goutte à goutte au mélange doucement (Cf. Figure 7 –Page 30) jusqu'à l'apparition d'une couleur jaune avec la formation d'un précipât de la même couleur, indiquant la présence de **phospholipides** (REVATHI SUCHMA et al., 2018).



Figure 7: Réactifs utilisés pour le test de phosphate.

## II.5 Tests de confirmation de production des biosurfactants

### II.5.1 Détermination de l'index d'émulsion E24

L'index d'émulsion permet de vérifier la capacité des souches à émulsionner une phase hydrophobe (le pétrole brut) dans une phase hydrophile (le milieu de culture).

Le test consiste à mélanger 3 ml de filtrat avec 3 ml de pétrole brute filtré dans des tubes stériles. Les tubes sont agités au vortex pendant 3min (Cf.Figure 8- Page 31).

Les tubes sont laissés au repos pendant 24 heures à température ambiante (BODOUR *et al.*, 2004). Ensuite des mesures ont été prises après 24heures et sept jours d'incubation.

Le calcul d'E24 est effectué selon la relation suivante :

$$E24 = (H_e / H_t) \times 100$$

-**H<sub>e</sub>** : hauteur de l'émulsion formé.

-**H<sub>t</sub>** : hauteur totale du mélange.



Figure 8 : Agitation des tubes.

### II.5.2 Test de déplacement d'huile

Dans une boîte de pétrie en verre de 15cm de diamètre contenant 40 ml d'eau distillée, un volume de 10 $\mu$ l de pétrole a été ajouté à la surface. 10  $\mu$ l du filtrat de culture est légèrement placé au centre du film de pétrole. Si le biosurfactant est présent dans le filtrat alors le pétrole sera déplacé et l'halo clair sera formé. Le diamètre de cette zone de dégagement sur l'huile est en corrélation avec l'activité du surfactant (MORIKAWA et *al.*, 1993).

### II.5.3 Méthode de drop Collapse

Les tests qualitatifs de drop collapse ont été performés sur des boîtes de pétri en verre, 2  $\mu$ l de pétrole ont été placées sur la boîte et laissés équilibrer pendant 24 h à température ambiante. Ensuite, 5  $\mu$ l du filtrat de culture ont été ajoutés à la surface du pétrole. Après une minute, si la goutte reste bombée le résultat est considéré comme négatif. Si la goutte diffuse ou s'effondre, le résultat est considéré comme positif (BOUDOUR et *al.*, 2003).

#### **II.5.4 Test de parafilm**

Une goutte de l'indicateur de bleu de Bromophénol est ajoutée à 2 ml du filtrat de culture. 10 µl (une goutte) de la solution échantillon ont été soigneusement ajoutés sur le parafilm-M avec une micropipette. Après 1 minute, la forme de la goutte sur la surface a été inspectée (YOUSSEF *et al.*, 2004 ; REVATHI SUCHMA *et al.*, 2018).

#### **II.6 Sélection des souches toxigènes**

##### **II.6.1 Obtention des extraits**

###### **II.6.1.1 Extraction liquide liquide**

La méthode d'extraction liquide-liquide (ELL) permet le transfert d'un soluté initialement contenu dans une phase liquide vers une autre phase liquide non miscible (EMURI *et al.*, 2010).

Le mélange binaire de solvants utilisés est composé de chloroforme, méthanol plus le jus de fermentation, volume par volume 25ml : 25ml : 25ml respectivement, après la formation de deux phases, la phase aqueuse est versée un ballon en verre et déposée sur un évaporateur rotatif à 40°C, pendant quelques minutes pour l'évaporation des solvants organiques. (Cf. Figure 9 – Page 33).



**Figure 9** : Extraction liquide-liquide.

### II.6.2 Test d'hémolyse

De nombreuses toxines provenant du milieu marin possèdent des propriétés hémolysantes, toxiques en particulier pour les poissons et les larves de coquillages (SALLENAVE, 1999).

Afin de rechercher l'activité éventuelle des extraits de culture des champignons isolés du milieu marin, nous avons utilisé la technique celle décrite par (ROCH et *al.*, 1990) qui consiste à utiliser des hématies humaines, en petits volumes, la lecture étant appréciée à l'œil nu.

Ce test a été réalisé sur les extraits organiques obtenus à partir des cultures liquides.

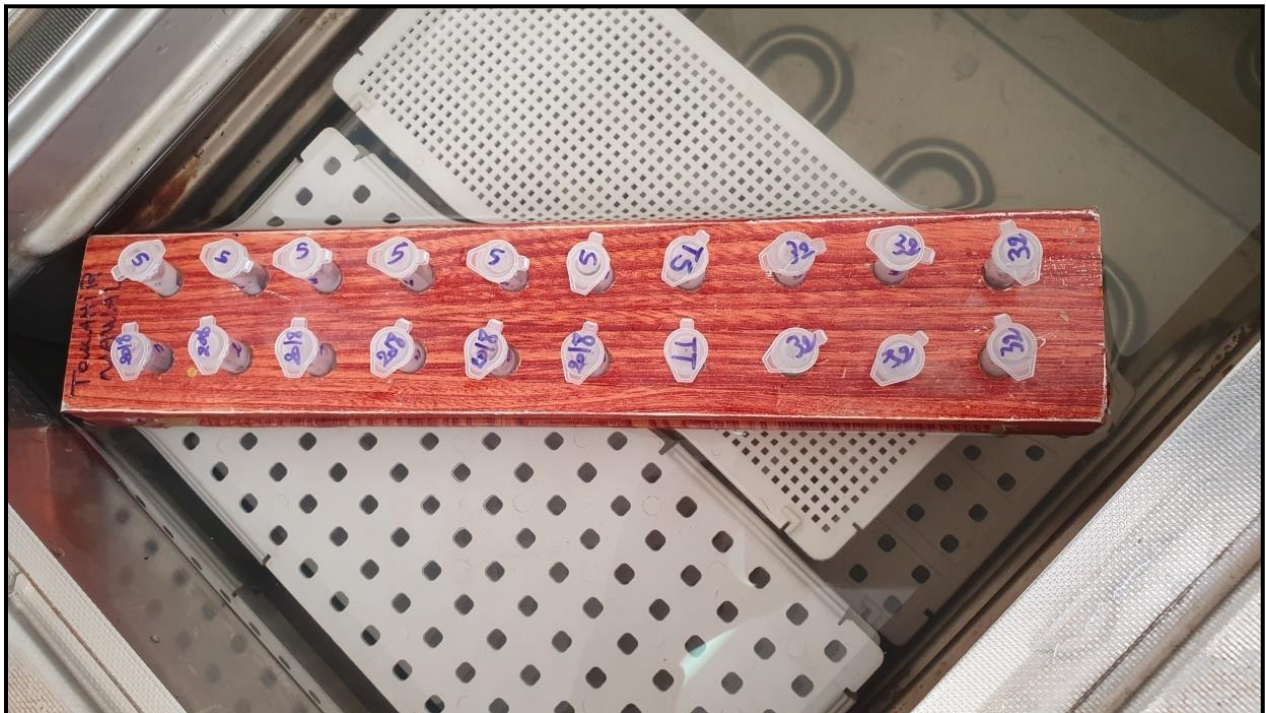
### II.6.2.1 Hémolyse sur hématies humaines, en petits volumes

Les hématies humaines sont lavées 3 fois dans une solution de NaCl à 9 g/l et remises en suspension dans cette même solution (suspension à 4%).

50  $\mu$ l de la substance à tester en solution dans l'eau sont mis en contact avec 50  $\mu$ l de la suspension d'hématies, soit un volume total de 100  $\mu$ l. Des témoins d'hémolyse spontanée et d'hémolyse totale sont réalisés respectivement avec 50  $\mu$ l de solution de NaCl à 9 g/l et 50  $\mu$ l d'eau distillée.

Une gamme de dilution est préparée par dilutions successives au  $\frac{1}{2}$  d'une solution-mère à 10 mg/ml. Les concentrations finales testées sont: 5- 2,5 - 1,25 - 0,625 - 0,312 et 0,156 mg/ml (SALLENAVE, 1999).

L'ensemble est mis à incuber pendant 1 h à 37°C au bain-marie. Après une heure de contact, la réaction est arrêtée par centrifugation pendant 4 min à 2500 tr/min. Pour une simple détection des extraits hémolytiques, l'observation de la coloration à l'œil nu est suffisante et permet d'apporter une première estimation de l'activité hémolytique (SALLENAVE, 1999). (Cf.Figure 10)



**Figure 10 :** Incubation de l'ensemble des dilutions au bain marie à 37°C.

## **II.7 Méthode de confrontation directe**

Au cours de la culture OSMAC (monosporique), on a constaté une inhibition de la croissance de certaines souches (*Aspergillus*) par une souche appartenant à la section des *Aspergillus terrei* (*Asp.t11*). Afin de déterminer son pouvoir inhibiteur sur les autres souches étudiées, une bouture de cette dernière a été placée dans des boîtes de pétri et conservée soigneusement à 4°C.

Le test de confrontation a été réalisé dans conditions aseptiques. Dans 5 boîtes de Pétri de 9cm de diamètre, un fragment d'environ 1cm du thalle de la souche test (*Asp.t11*) considérée comme inhibitrice (I) a été mis avec des fragments de souches fongiques différentes (H4, 010.23.09. PDA, 015.23.09.2020, 009 G1 Asp Tamari MEA, S35 34 03.03-2 MEA). Ils ont été prélevés à l'aide d'un cure-dent stérile, ensuite ils ont été repiqués dans des milieux de cultures différents (MEA, CZ, GN25) en laissant 1cm de diamètre de part et d'autre de la boîte pour chaque fragment.

L'incubation a été réalisée à 25°C jusqu'à envahissement totale du thalle. La lecture des résultats constituent à la mesure du diamètre de la souche inhibitrice et la souche test après prolifération.

# *Chapitre III*

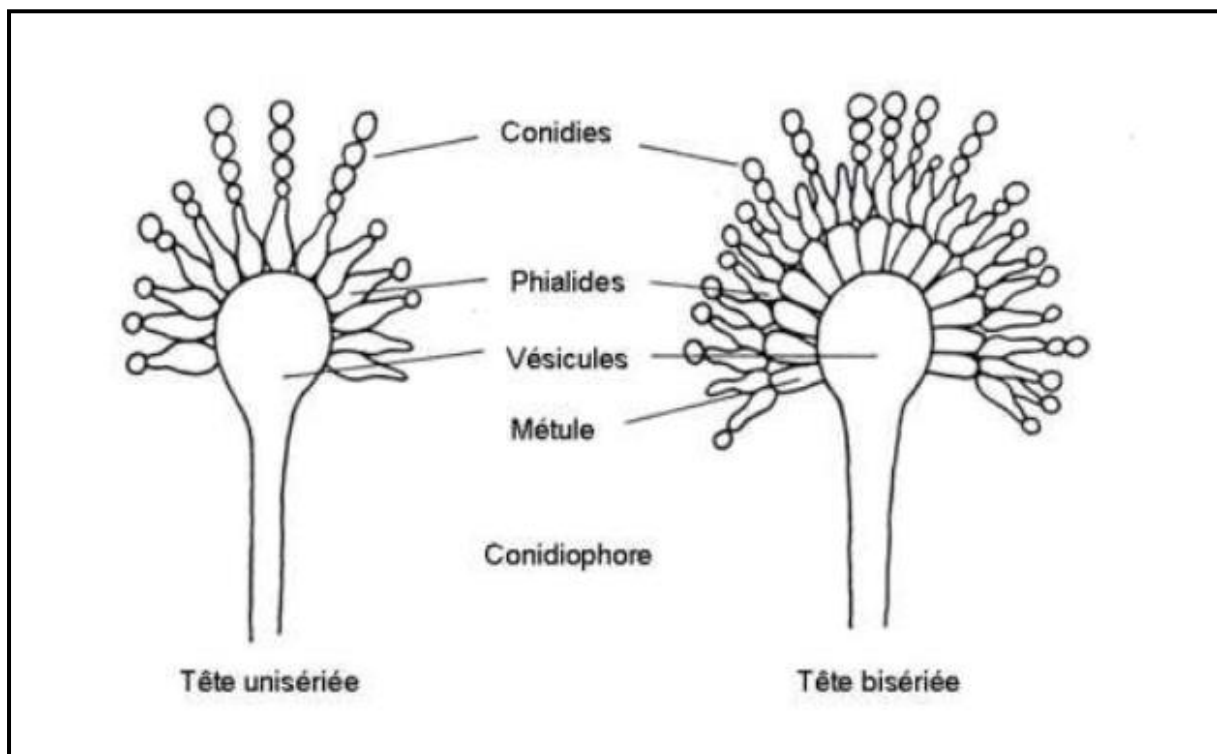
## *Résultats et discussion*

### III.1 Description et illustration des genres étudiés

#### III.1.1 Le genre *Aspergillus*

##### III.1.1.1 Structure morphologique

*Aspergillus* est un genre fongique anamorphe (forme asexuée) se reproduisant par production de conidies se formant à l'extrémité de phialides. Les *Aspergillus sp* possèdent un mycélium végétatif constitué d'hyphes septés hyalins portant des conidiophores de forme caractéristique permettant leur identification au niveau du genre (Cf. Figure 11). Ces conidiophores sont les structures permettant la reproduction végétative. Ils sont constitués d'un stipe non ramifié se dressant à partir des hyphes végétatifs et se terminant par une vésicule dont la forme varie selon l'espèce (globuleuse, sphérique, pyriforme, claviforme ou en forme de spatule). Chez certaines espèces, les phialides produisant les conidies sont directement formées sur la vésicule, on parle de forme unisériée. D'autres espèces possèdent une autre structure entre la vésicule et les phialides, nommée métule, ces espèces sont dites bisériées. Une des particularités des *Aspergillus* par rapport aux autres genres fongiques est que les phialides et les métules apparaissent simultanément sur les vésicules (KLICH, 2002).



**Figure 11:** Structure des conidiophores chez le genre *Aspergillus* (BOTTON et al., 1990).

### **III.1.1.2 Caractères culturels généraux**

Les *Aspergillus* présentent une croissance rapide sur les milieux de culture classiques (gélose au malt, Sabouraud) additionnés d'antibiotiques. Après 48 heures d'incubation, on observe des colonies plates, formées de courts filaments aériens, blancs; après 96 heures d'incubation, les colonies vont prendre leur teinte caractéristique, brune, verte, jaune ou noire selon les espèces. La majorité des *Aspergillus* poussent à 22-25°C; les espèces thermophiles (*A. fumigatus*) se développent à 37-40°C et parfois jusqu'à 57°C (BADILLET et al., 1987 ; MORIN, 1994).

Les *Aspergillus* forment des colonies souvent poudreuses ou granuleuses. La couleur des colonies permet une orientation rapide dans l'identification d'espèce: gris-vert pour *A. fumigatus*, vert-jaune pour *A. flavus* et les espèces du groupe *A. glaucus*, vert foncé à chamois pour *A. nidulans*, brun cannelle pour *A. terreus*, chamois clair, jaune et rose pour *A. versicolor*, jaune puis noir pour *A. niger* et blanche pour *A. candidus*. Le revers de la colonie est incolore ou jaune, mais il peut brunir ou rougir avec l'âge (CHERMETTE et BUSSIERAS, 1993).

### **III.1.1.3 Identification macroscopique et microscopique des isolats du genre *Aspergillus***

Après sept jours d'incubation sur les différents milieux de culture (PDA, MEA, CYA à 25°C, CYA à 37°C, CYAs, Cz, et GN25), et à partir des observations culturelles et microscopiques des souches fongiques du genre *Aspergillus*, on a essayé d'identifier l'espèce en se basant sur les clés d'identification présenté par KLICH (2002), en prenant compte la forme de la tête aspergillaire et la taille des conidies, des vésicules, ainsi que la taille des conidiophores.

Les résultats sont présentés dans le tableau 6 Page 39 :

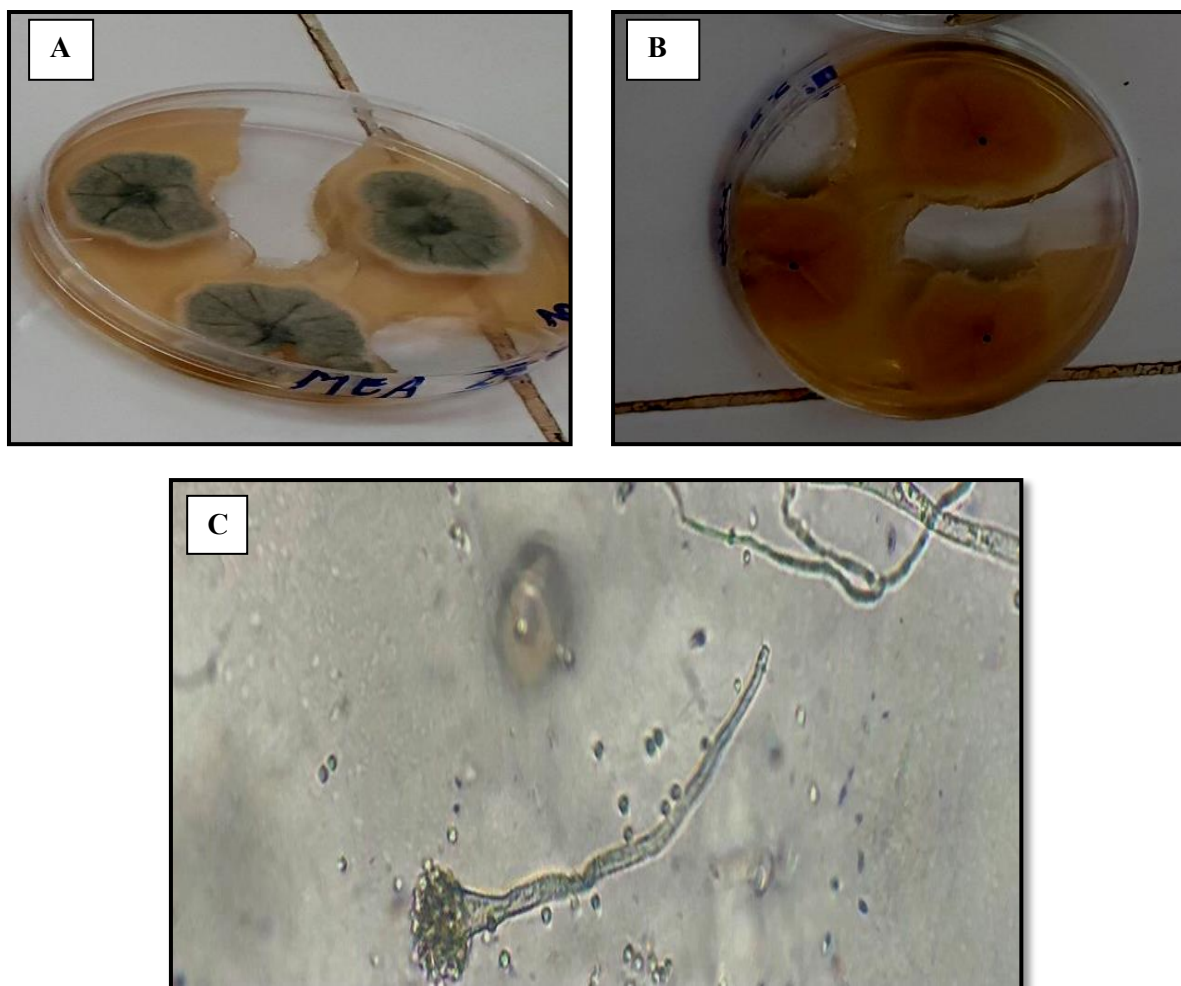
**Tableau 6:** Caractères macroscopiques et microscopiques des espèces identifiées appartenant au genre *Aspergillus*.

Souche s	Tête aspergillaire	Conidiophore		Vésicule		Conidie			Les espèces identifiées du genre <i>Aspergillus</i>
		Longueur en $\mu\text{m}$	Texture	Diamètre en $\mu\text{m}$	Forme	Forme	Longueur en $\mu\text{m}$	Texture	
1	Bisériée	800	Rugueu x	14	Hémisphérique	Globuleuse à finement rugueuse	3	Lisse	<i>A.ochraceus</i>
10	Unisériée	300	Lisse	25	Hémisphérique	Ronde	3	Echinulé ou lisse	<i>A.fumigatus</i>
20	Bisériée	400	Rugueu x	20	Globuleuse	Globuleuse	3	Lisse	<i>A.melleus</i>
21	Bisériée	200	Lisse	14	Hémisphérique	Globuleuse à légèrement elliptique	2	Lisse	<i>A.terreus</i>

### III.1.1.3.1 *Aspergillus fumigatus*

*Aspergillus fumigatus* est une espèce thermotolérante dont la température de croissance est comprise entre 15 et 48°C; la température optimale étant située aux alentours de 40 et 42°C. Cette espèce peut se développer jusqu'à 57°C (MORIN, 1994).

*A. fumigatus* forme des colonies d'abord blanches, puis bleu-vertes et enfin vert foncé à gris noirâtre. Le revers peut être incolore, jaune, vert ou brun-rouge suivant les souches.



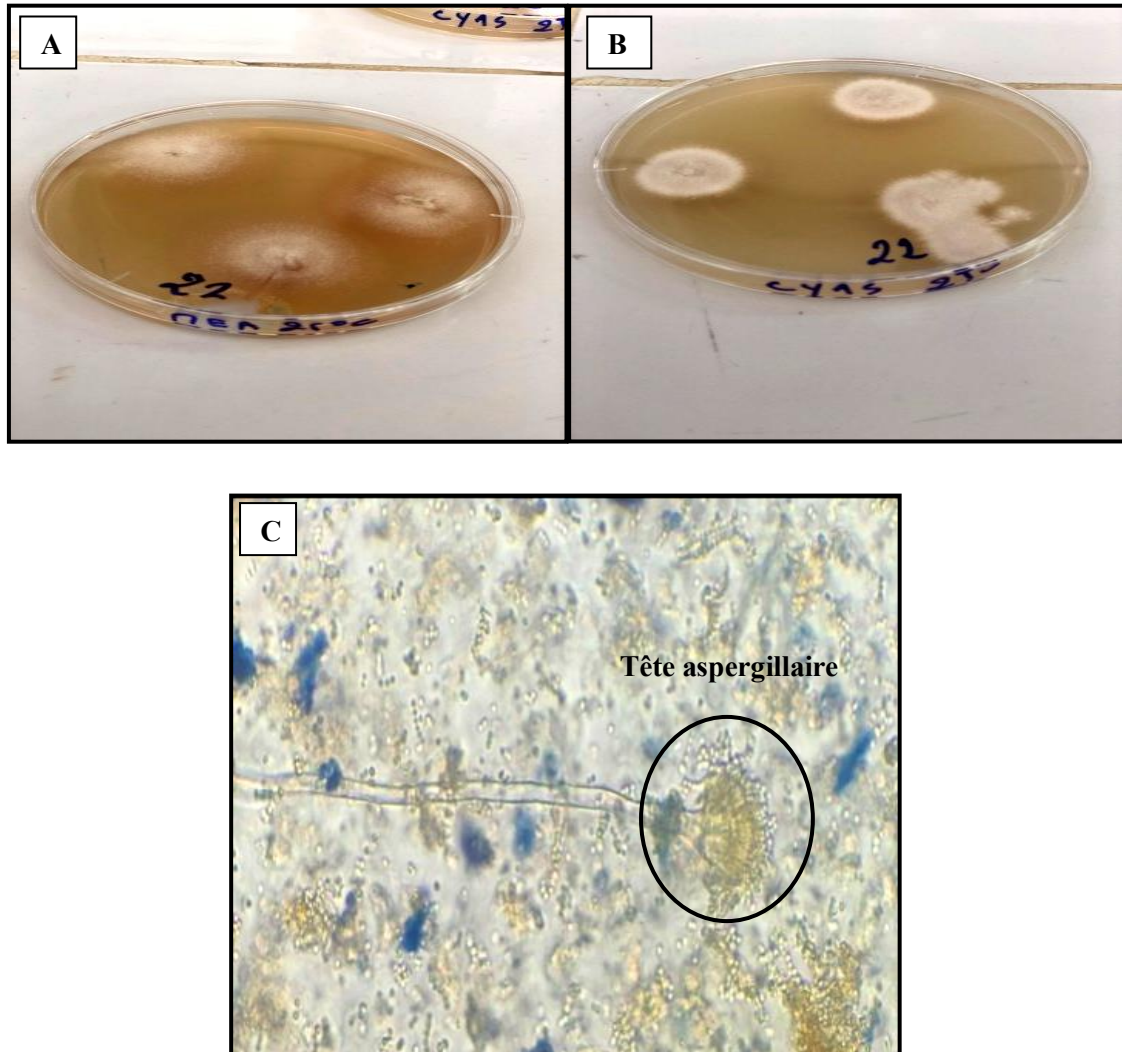
**Figure 12:** *Aspergillus fumigatus*, (A, B) : Aspect macroscopique sur gélose MEA recto verso de gauche vers la droite respectivement. (C) : Aspect microscopique (x40).

### III.1.1.3.2 *Aspergillus terreus*

*Aspergillus terreus* est une espèce fréquente dans les sols, il contribue à la dégradation des matières organiques en raison de ses activités cellulolytiques. Mais il est également présent sur les céréales en stockage, les épices, et divers végétaux. Il contamine souvent les aliments pour animaux d'élevage.

Espèce thermopréférante et osmopréférante. Colonies veloutées parfois floconneuses, brun sale, couleur terreuse, revers jaune à brun sale, exsudat ambré parfois abondant.

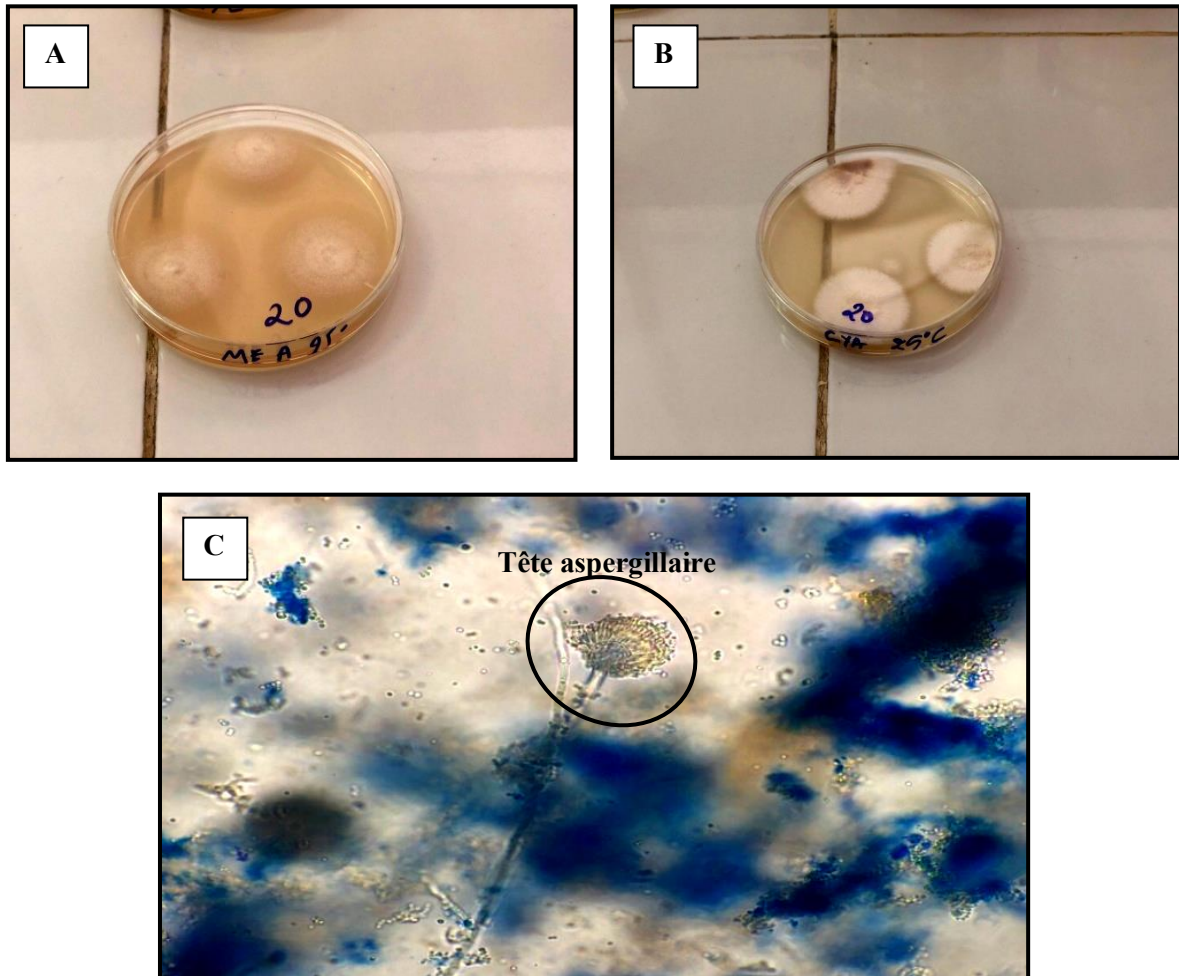
[<https://www.univ-brest.fr/esiabscientifique/Mycologie/Les+fiches+pratiques/A.terreus>]



**Figure 13:** *Aspergillus terreus* 3, (A, B) : Aspect macroscopique sur gélose MEA et CYAs de gauche vers la droite respectivement. (C) : Aspect microscopique coloré par le bleu de méthylène (x40).

### III.1.1.3.3 *Aspergillus melleus*

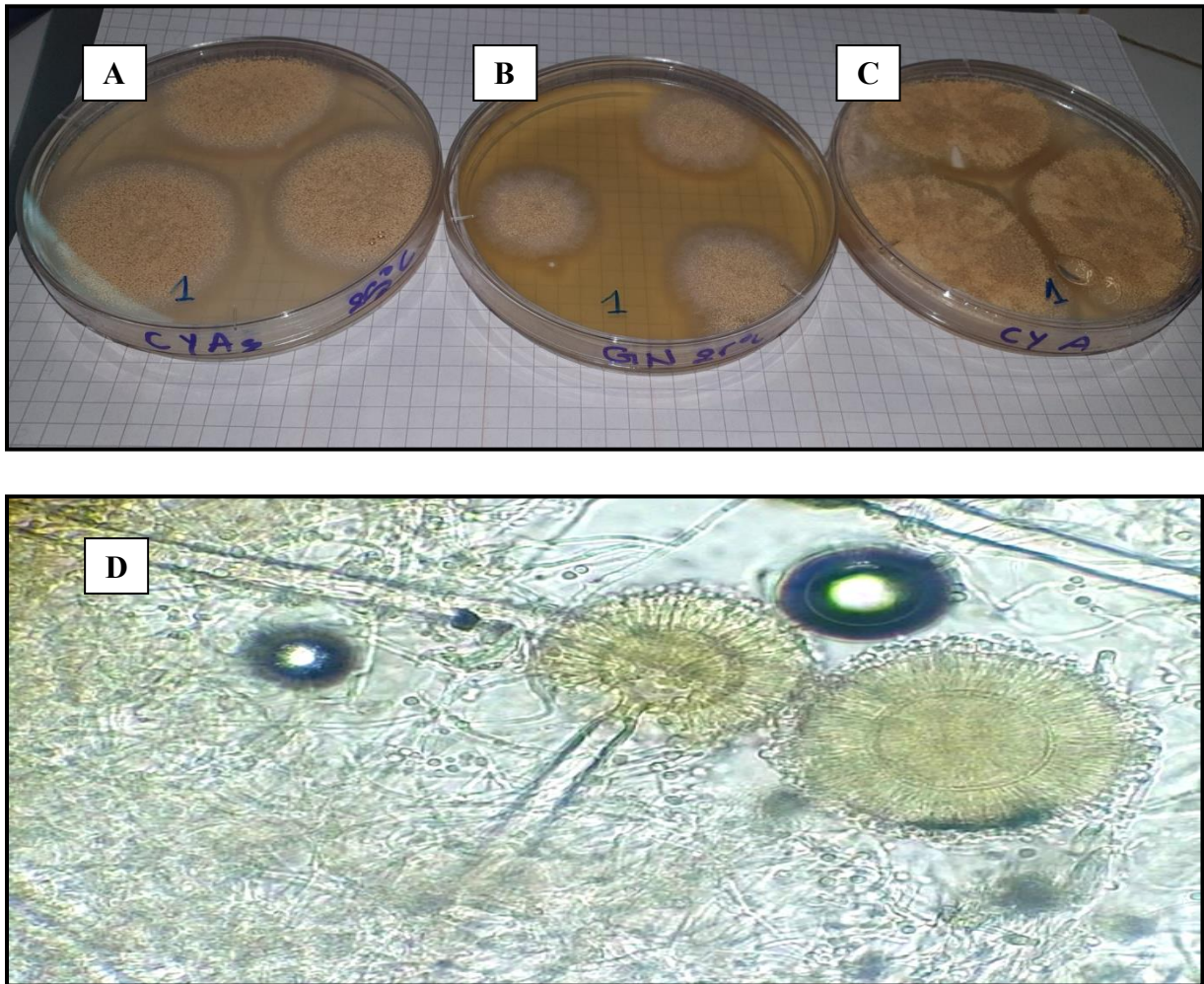
*Aspergillus melleus* appartient au sous-genre *Circumdati*, section *Circumdati* et au groupe *Aspergillus ochraceus* (SAMSON et al., 2014 ; VISAGIE et al., 2014). C'est un champignon de distribution ubiquitaire, présent dans le sol, les plantations ou les aliments (NOONIM et al., 2008), et a la capacité de produire des enzymes protéolytiques (LUISETTI et al., 1991) et des composés insecticides (OOIKE et al., 1997).



**Figure 14:** *Aspergillus melleus1*, (A, B) : Aspect macroscopique sur gélose MEA et CYA de gauche vers la droite respectivement. (C) : Aspect microscopique coloré par le bleu de méthylène (x40).

#### III.1.1.3.4 *Aspergillus ochraceus*

*Aspergillus ochraceus* est une espèce fréquente dans les sols, les grains en stockage. Il est couramment présent sur les grains de café, les épices. *A. ochraceus* est une espèce productrice d'ochratoxines. Espèce mésophile, osmotolérante, présentant une vitesse de croissance moyenne. [<https://www.univ-brest.fr/esiabscientifique/Mycologie/Les+fiches+pratiques>]



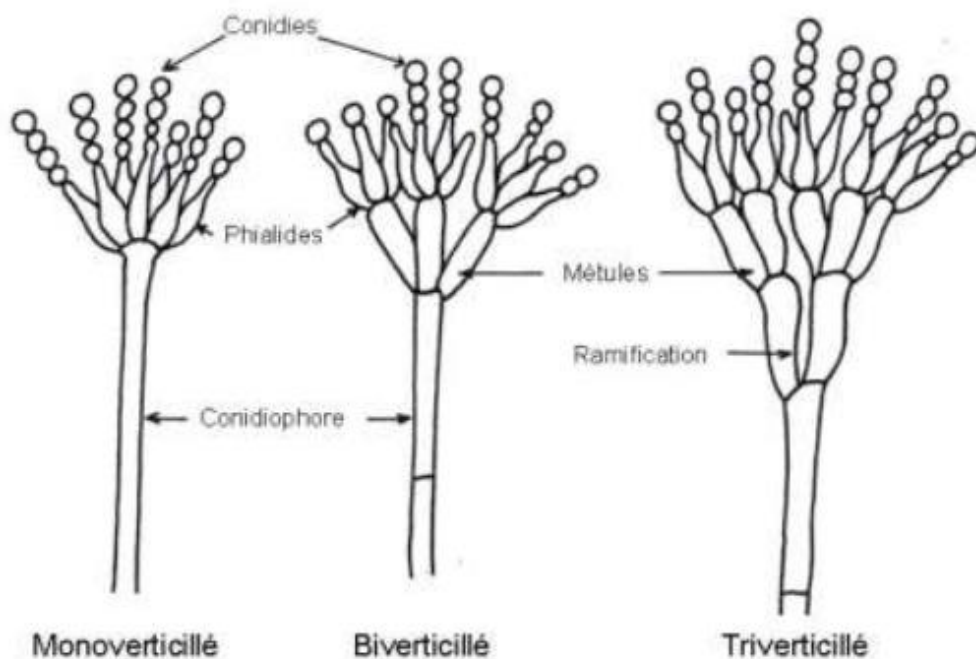
**Figure 15:** *Aspergillus ochraceus* I, (A, B, C) : Aspect macroscopique sur gélose CYAs, GN25 et CYA de gauche vers la droite respectivement. (D) : Aspect microscopique (x40).

### III.1.2 Le genre *Penicillium*

#### III.1.2.1 Structure morphologique

Les *Penicillium* *sp* sont des champignons filamenteux microscopiques dont le mycélium végétatif est constitué d'hyphes septés hyalins ou peu colorés. *Penicillium* est un genre anamorphe se reproduisant par la production abondante de conidies. Les conidiophores (structure de reproduction asexuée) se forment perpendiculairement au mycélium de façon isolés ou groupés en faisceaux plus ou moins structurés. Ils sont hyalins, lisses ou granuleux, plus ou moins ramifiés et se terminent par un ensemble de phialides prenant une forme de « petits pinceaux » ou pénicilles, caractéristiques du genre *Penicillium*. La constitution de ces pénicilles est un des critères de classification des espèces (Cf.Figure 16 – Page 44): ils

peuvent être constitués d'un simple verticille de phialides (espèces monoverticillées), d'un verticille de ramifications constituées de métules portant les phialides (espèces biverticillées) ou de plusieurs verticilles successifs composés de ramifications, de métules et de phialides (espèces tri- ou quadriverticillées). Les phialides, ampulliformes ou lancéolées, produisent à leur apex des chaînettes de conidies dont les caractéristiques (forme, couleur, ornementation) constituent également des critères d'identification (PITT, 1979 ; BOTTON *et al.*, 1990).



**Figure 16:** Structure des conidiophores chez le genre *Penicillium* (BOTTON *et al.*, 1990).

### III.1.2.2 Caractères cultureux généraux

Les *Penicillium* se développent rapidement et facilement sur les milieux de culture utilisés en routine (géloses au malt, Sabouraud). Ils se développent à des températures modérées de l'ordre de 20-27°C. Après 2 jours d'incubation, on observe des petites colonies plates, formées de courts filaments aériens, habituellement blancs. Après 3-4 jours d'incubation, la sporulation va conférer aux colonies leur teinte, le plus souvent dans les tons vert, vert bleu, vert-gris, vert-jaune, gris-bleu mais aussi, pour certaines espèces, jaune, orange, chamois, rose, ou rouge (CHERMETTE et BUSSIERAS, 1993).

### III.1.2.3 Identification macroscopique et microscopique des isolats du genre *Penicillium*

Après sept jours d'incubation sur les sept milieux de culture (PDA, MEA, CYA à 25°C, CYA à 37°C, CYAs, Cz et GN25), et à partir des observations macro et microscopiques des souches fongiques du genre *Penicillium*, l'identification a pu être réalisée en se basant sur les clés d'identification présentées par PITT (1988) en prenant compte la couleur, la forme et la taille des conidies et des phialides, ainsi que la taille des conidiophores.

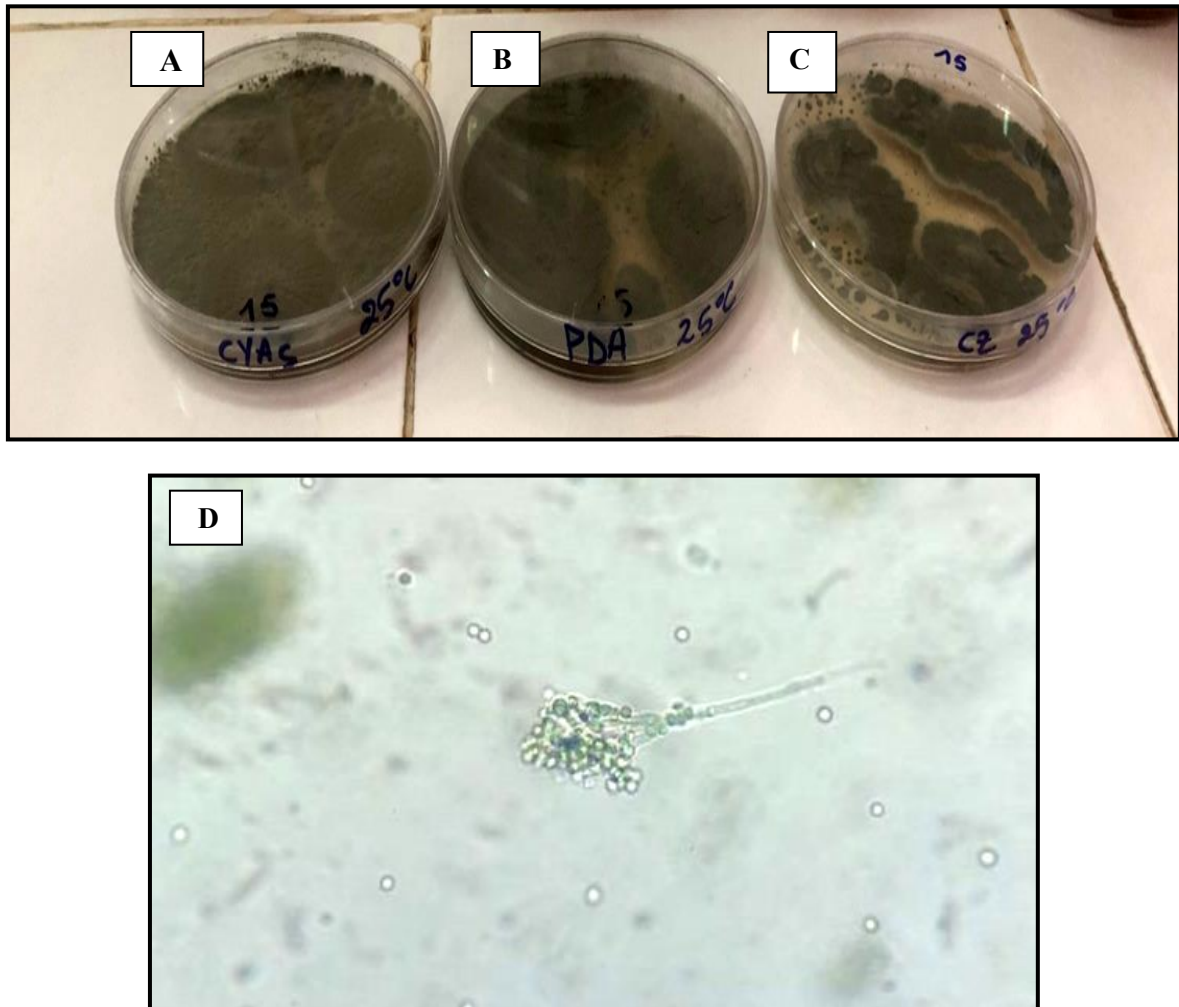
Les résultats sont présentés dans le tableau suivant (Cf. Tableau 7) :

**Tableau 7:** Caractères macroscopiques et microscopiques des espèces identifiées appartenant au genre *Penicillium*.

Souches	Couleur des conidies	Texture des conidies	Taille des conidies	Taille de phialide	Conidiophore	L'appareil sporifère	Les espèces identifiées du genre <i>Penicillium</i>
15	Transparente	Lisse	5µm	63µm	150µm	Triverticilé	<i>P.roqueforti</i>
16	Verte	Lisse	4µm	65µm	167µm	Triverticilé	<i>P.chrysogenum</i>
6	Verte	Lisse	6µm	50µm	120µm	Biverticilé	<i>Penicillium sp5</i>
8	Transparente	Lisse	6µm	40µm	125µm	Biverticilé	<i>Penicillium sp7</i>

#### III.1.2.3.1 *Penicillium roqueforti*

*Penicillium roqueforti* est un champignon saprophyte commun, qui est répandu dans la nature et peut être isolée du sol, des matières organiques en décomposition. Dans certaines conditions de croissance, la plupart des souches sont capables de produire des métabolites secondaires nocifs (PEBERDY, 1985).

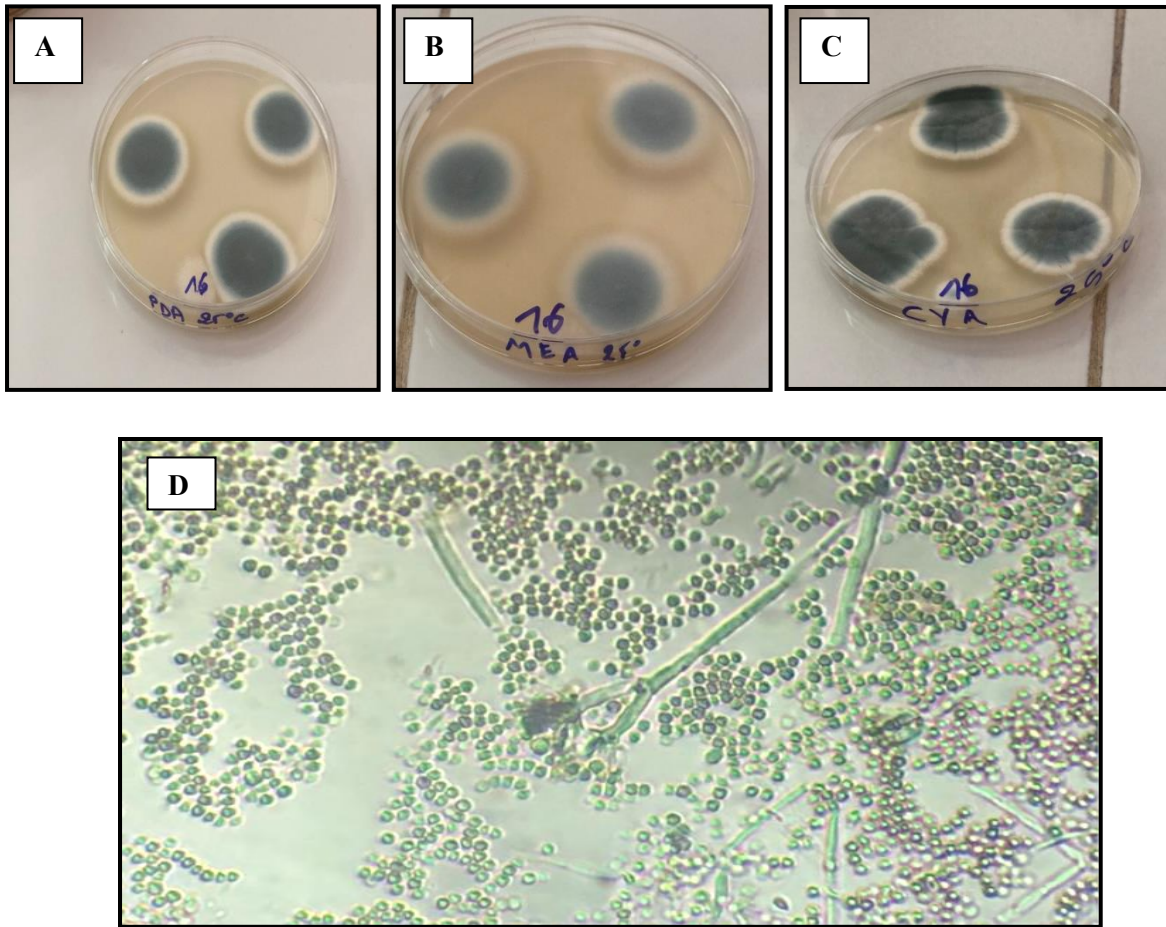


**Figure 17:** *Penicillium roqueforti*, (A, B, C) : Aspect macroscopique sur gélose CYAs, PDA et CZ de gauche vers la droite respectivement. (D) : Aspect microscopique (x40).

### III.1.2.3.2 *Penicillium chrysogenum*

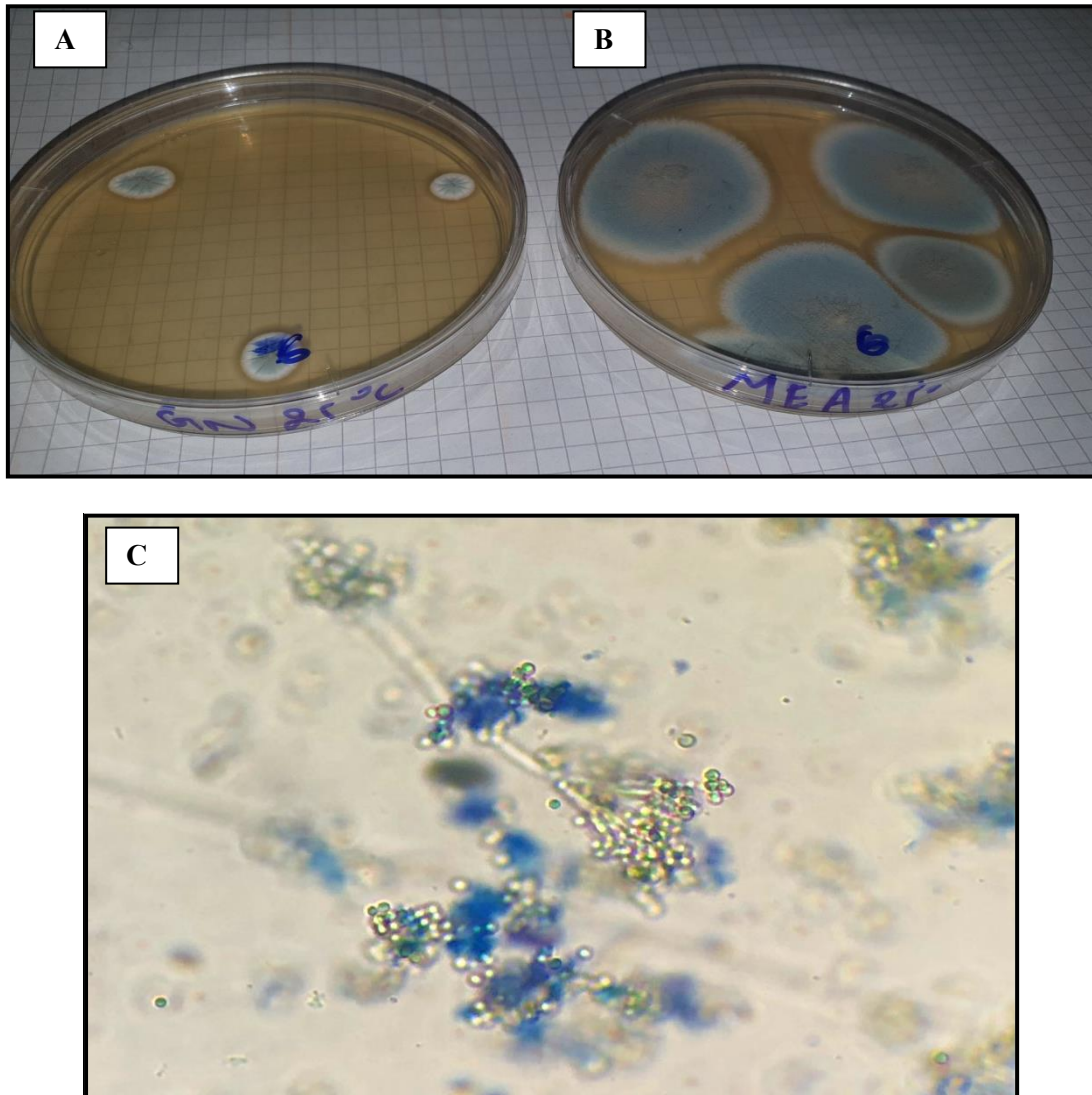
*Penicillium chrysogenum* est un champignon du sol, retrouvé sur végétaux en décomposition et sur les aliments.

*Penicillium chrysogenum* était autrefois nommé *P. notatum*, c'est le champignon utilisé pour la production de la pénicilline. [<https://www.univ-brest.fr/esiabscientifique/Mycologie/Les+fiches+pratiques/penchrysogenum>]



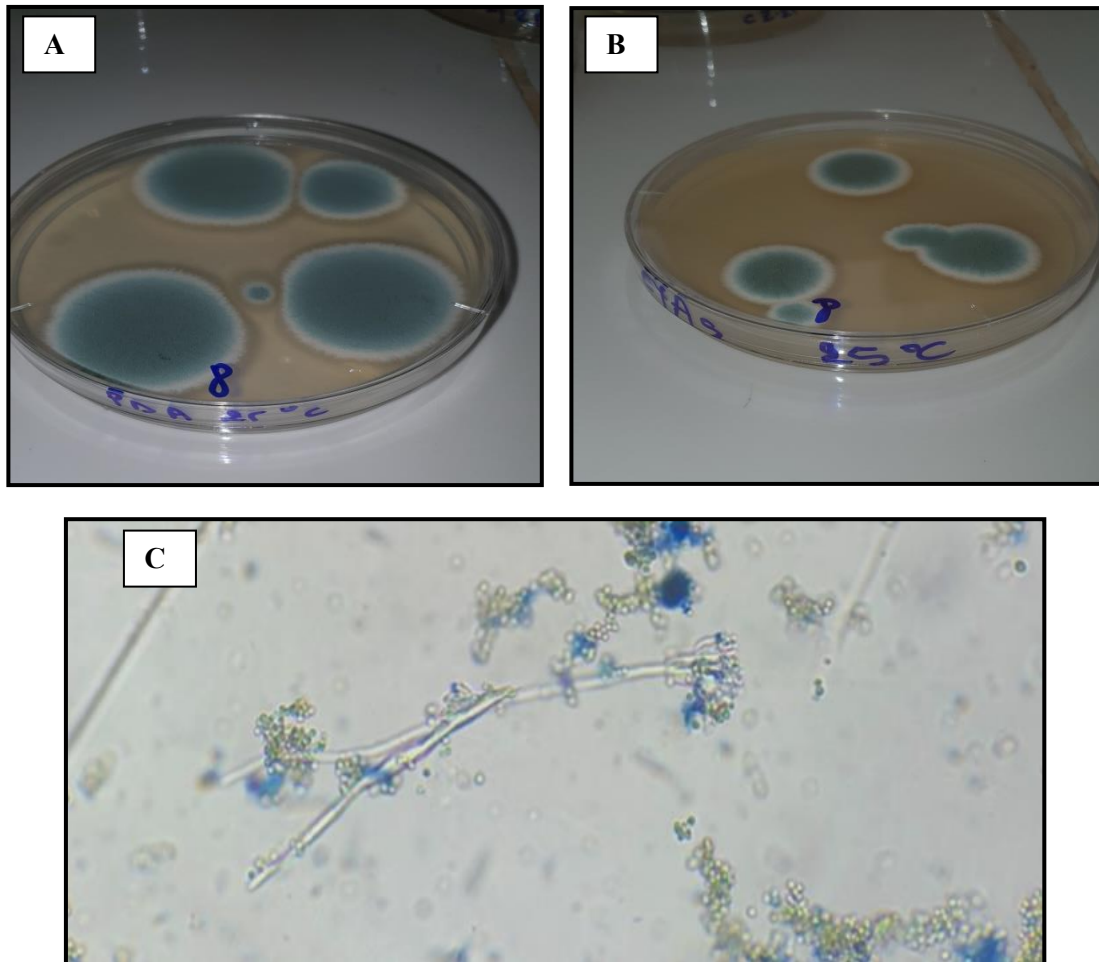
**Figure 18:** *Penicillium chrysogenum*, (A, B, C) : Aspect macroscopique sur gélose PDA, MEA et CYA de gauche vers la droite respectivement. (D) : Aspect microscopique (x40).

III.1.2.3.3 *Penicillium sp5*



**Figure 19 :** *Penicillium sp5*, (A, B) : Aspect macroscopique sur gélose GN 25 et MEA de gauche vers la droite respectivement. (C) : Aspect microscopique coloré par le bleu de méthylène (x40).

**III.1.2.3.4 *Penicillium sp7***

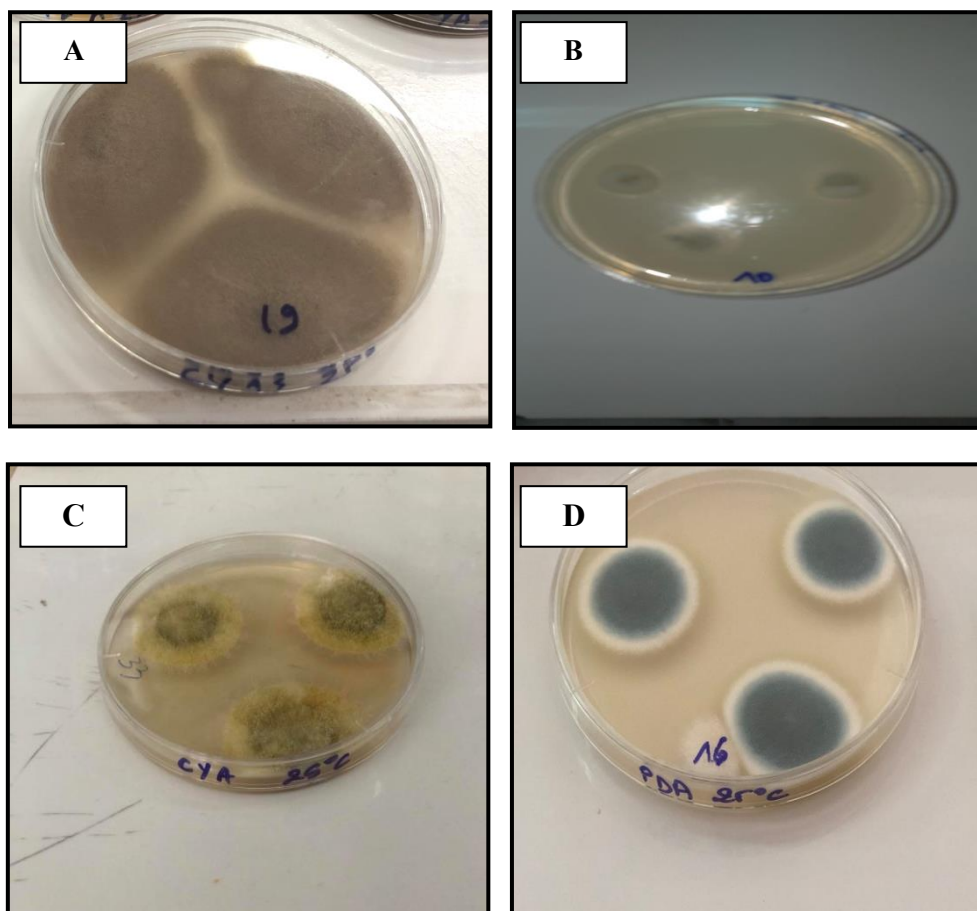


**Figure 10:** *Penicillium sp7*, (A, B) : Aspect macroscopique sur gélose PDA et CYAs de gauche vers la droite respectivement. (C) : Aspect microscopique coloré par le bleu de méthylène (x40).

**III.2 Suivi de la vitesse de croissance des souches**

Après 21 jours d'incubation, l'observation macroscopique et microscopique des 34 isolats fongiques répertoriées au port d'Alger et conservées à la mycothèque propre à madame BOURABAIN Fouzia, nous a permis de sélectionner des souches fongiques appartenant à différents genres dans le but d'étudier leurs vitesse de croissance sur différents milieux de culture à savoir PDA, MEA, CYA, CYAs, Czapek et GN25.

Aspect macroscopiques de quelques souches fongiques sélectionnées :



**Figure 211** : Aspect macroscopique des souches fongique sur les différents milieux de culture de gauche vers la droite respectivement, **(A)** : *Aspergillus terreus2* après 21 jours d'incubation à 25°C sur gélose CYAs , **(B)** : *Aspergillus fumigatus* sur gélose Cz, **(C)** : *Aspergillus pseudoglaucus2* sur gélose CYA ; et **(D)** : *Penicillium chrysogenum* sur gélose PDA, après 7 jours d'incubation.

D'après les résultats obtenus, on remarque que l'aspect macroscopique des souches sur les milieux de culture reste différent d'une souche à une autre à savoir les couleurs et la taille des colonies, ainsi que la production de métabolites par les différentes souches testés.

A fin de mieux étudier l'effet de la composition des milieux de culture sur la croissance fongique, nous avons réalisé des courbes qui représentent le diamètre de la colonie en fonction des jours d'incubation (Cf. Figure 22, 23, 24, 25 – Page 51, 51, 52, 52, respectivement).

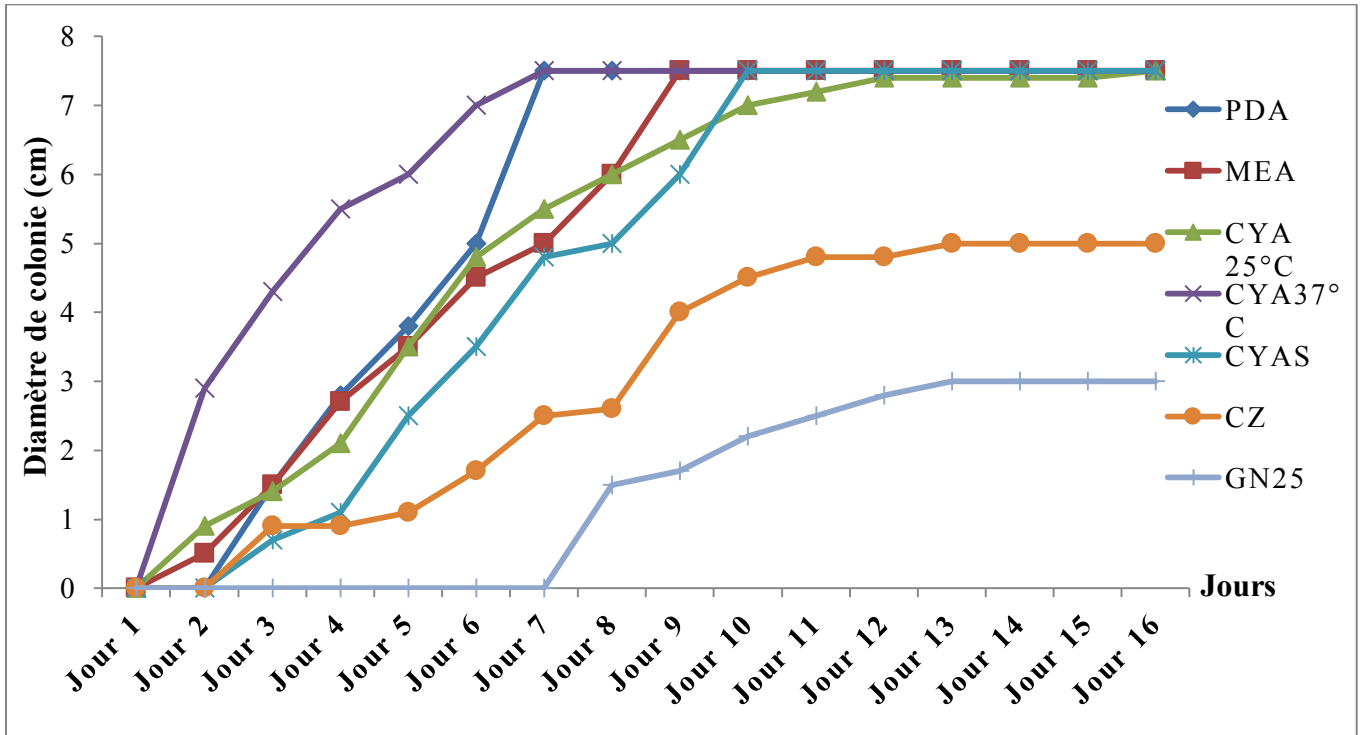


Figure 22: Courbe de croissance de *Aspergillus terreus2* en fonction du milieu de culture.

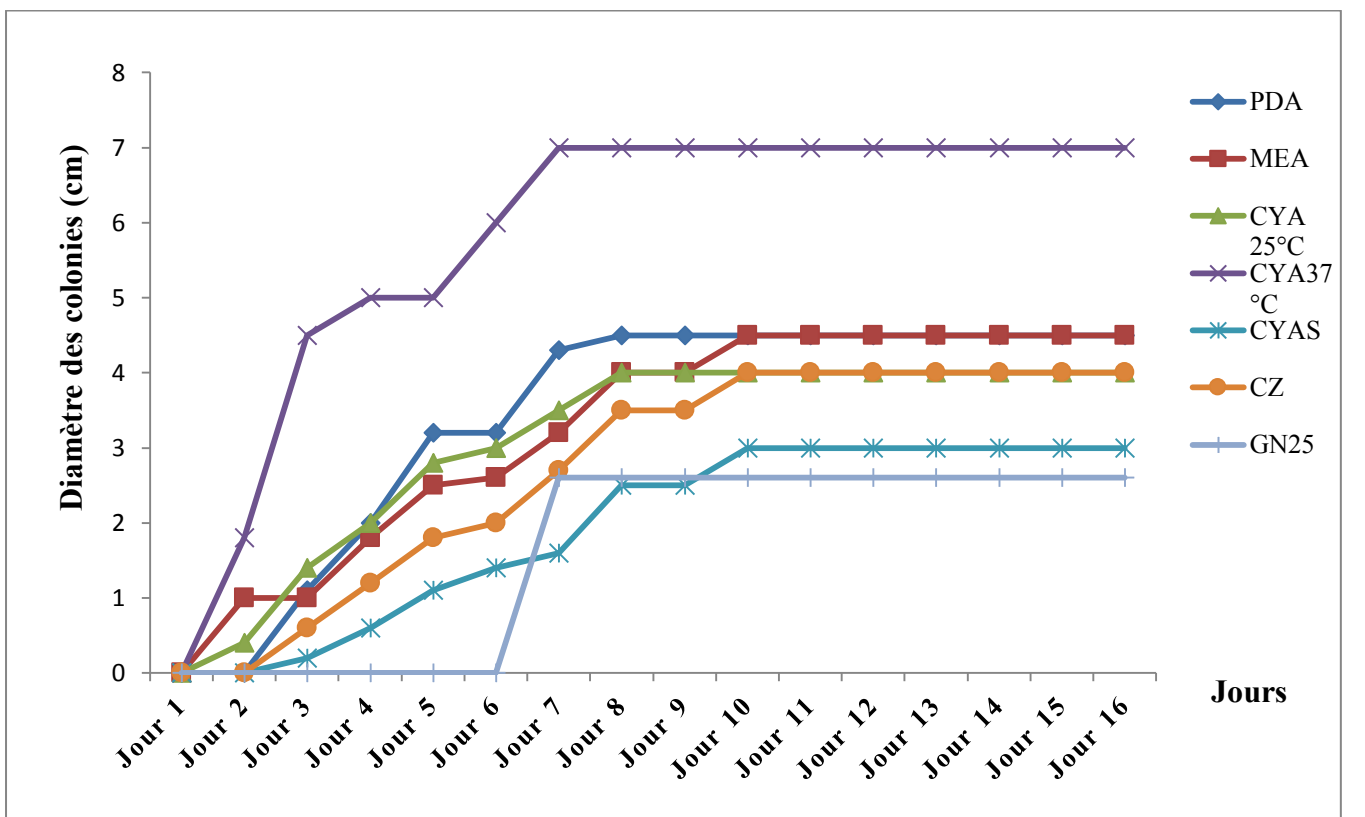


Figure 23 : Courbe de croissance de *Aspergillus fumigatus* en fonction du milieu de culture.

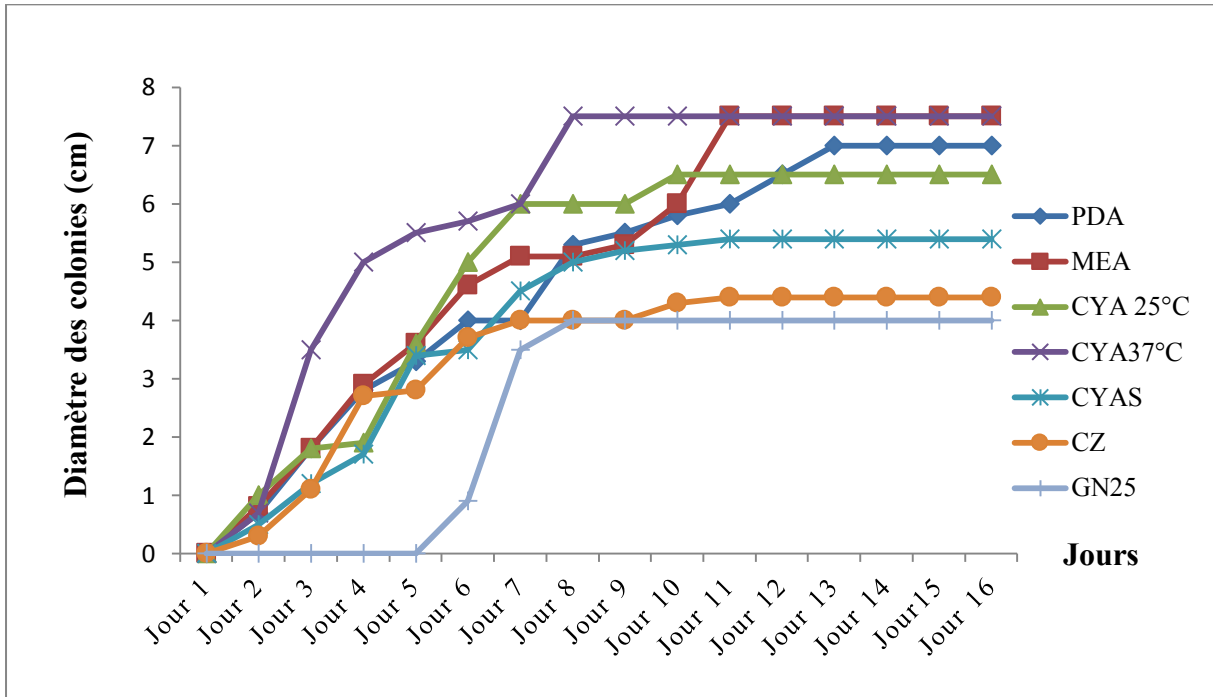


Figure 24: Courbe de croissance de *Aspergillus pseudoglaucus2* en fonction du milieu de culture.

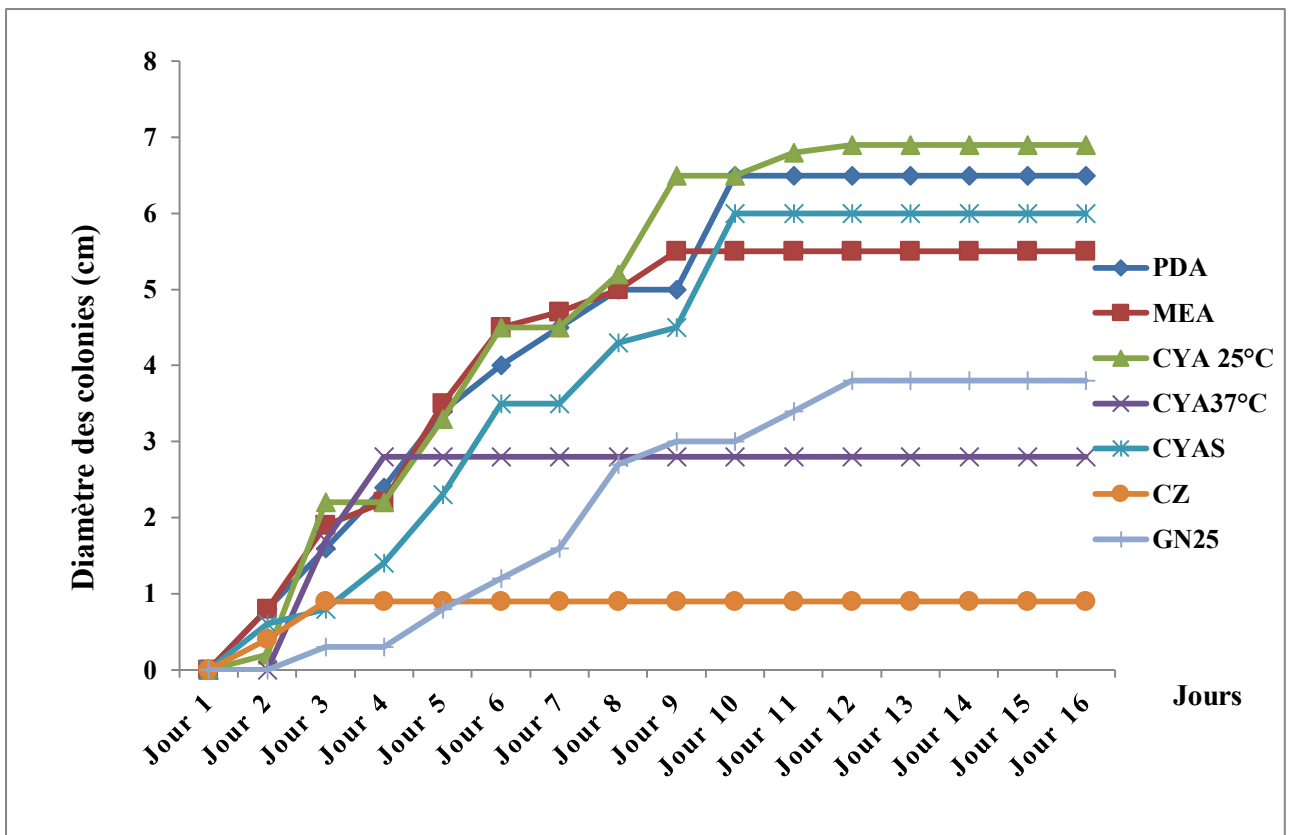


Figure 25 : Courbe de croissance de *Penicillium chrysogenum* en fonction du milieu de culture.

Les résultats enregistrés dans les figures précédentes (Cf. Figure 22, 23, 24, 25) présentent la vitesse de croissance des souches mycéliennes avec une phase de latence, une phase de croissance, un ralentissement de croissance et une phase stationnaire qui correspond à l'épuisement de la source de carbone dans le milieu de culture.

D'après les courbes précédentes, on remarque une bonne croissance des souches qui s'est traduit par un étalement radiale du thalle (augmentation du diamètre) des colonies pour les espèces *Aspergillus terreus*, *Aspergillus fumigatus* et *Penicillium chrysogenum* sur les cinq milieux de culture (CYA, PDA, CYAs, MEA, CZ), sauf pour le milieu GN25 où la croissance des colonies était plus lente. On a enregistré un ralentissement de croissance et une phase stationnaire sans jamais envahir totalement la surface du milieu. Cependant *Aspergillus pseudoglaucus*, a montré une bonne croissance sur les milieux (CYA, PDA, CYAs, MEA) avec une faible croissance sur les autres milieux (GN25 et CZ).

Après sept jours d'incubation la croissance commence à être stable pour toutes les souches sur les différents milieux jusqu'au dernier jour d'incubation.

Pour conclure, on peut dire que les résultats recensés dans la présente étude ont montré que les souches de la mycothèque énumérées au port d'Alger, examinées dans les mêmes conditions de culture présentent une croissance différente, ceci reste principalement lié aux conditions favorables à son développement. Il y a eu des effets des milieux de culture sur le développement des différentes souches testées, certains milieux sont considérés optimaux pour la croissance par leur importante richesse en nutriment et en source principale de carbone, tandis que d'autres ne contribuent pas à l'amélioration du rendement fongique pour un développement meilleur.

#### **III.3 Suivi de la croissance des souches fongiques sur un milieu enrichi de pétrole brut et d'huile d'olive**

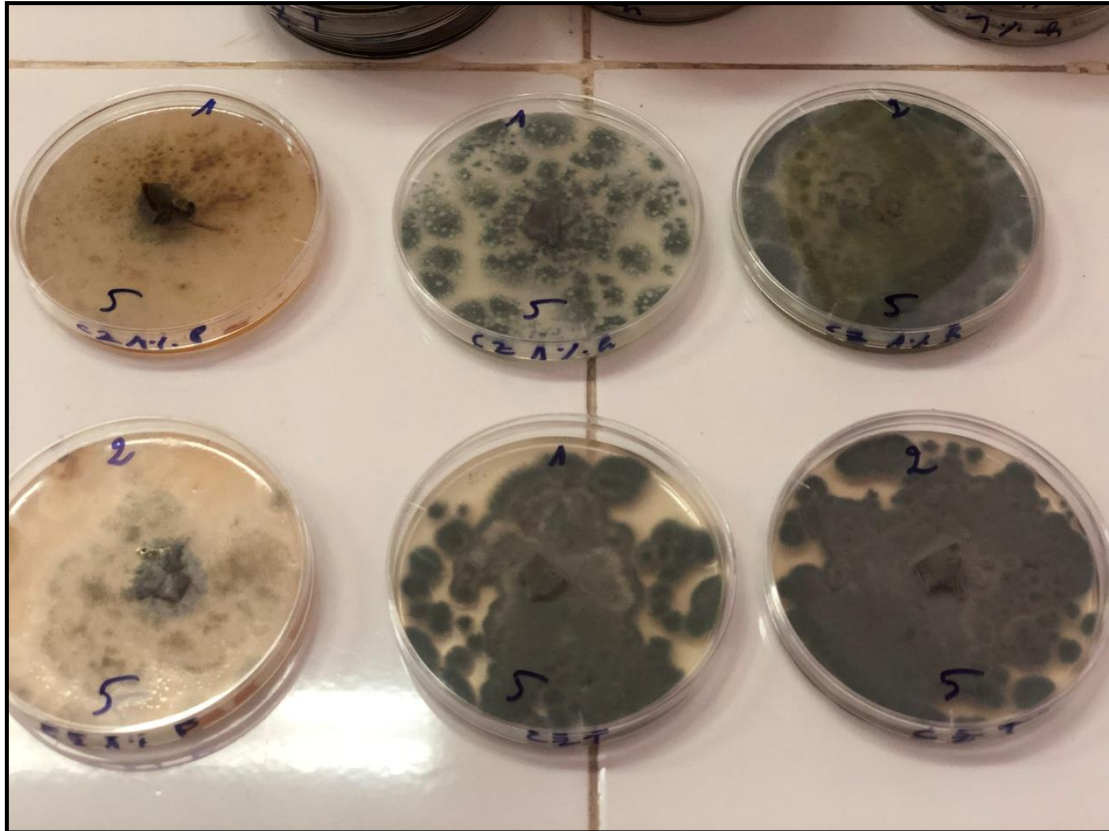
Parmi les 28 isolats testés, seulement 3 souches ont été sélectionnées pour représenter les résultats obtenus graphiquement, selon la croissance sur les différents milieux (Cz.T, Cz 1%P, Cz 1%H), comme suivant :

Celle qui a bien répondu sur tous les milieux.

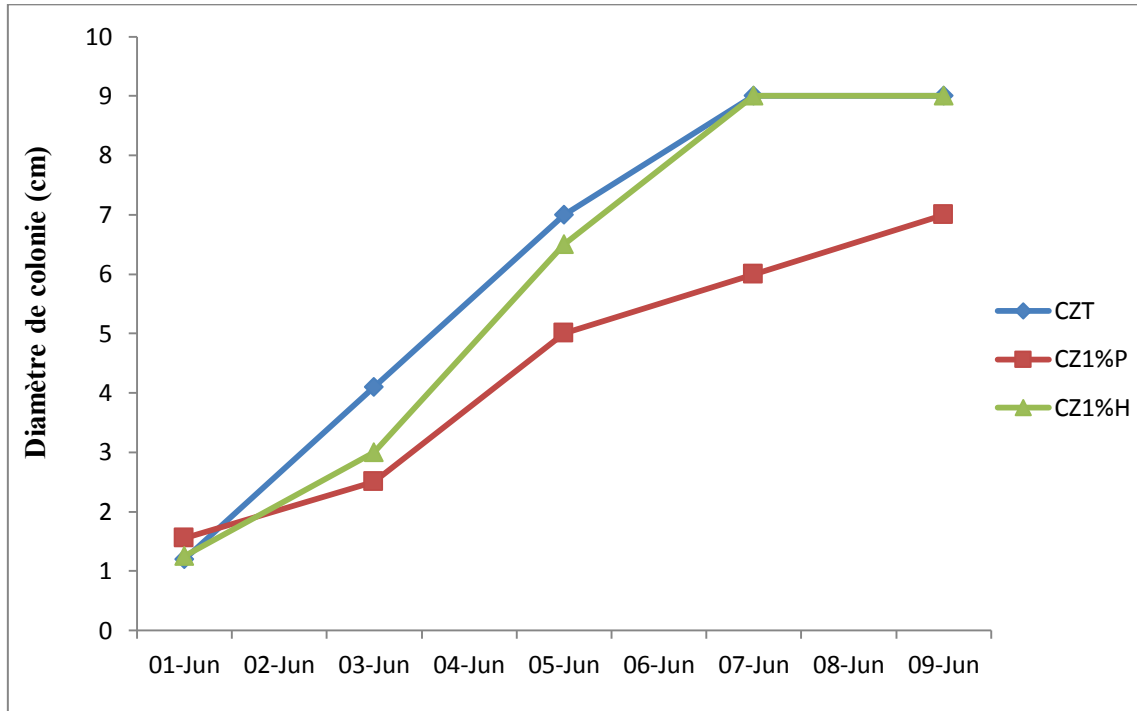
Celle qui n'a pas répondu sur le milieu contenant du pétrole.

Celle qui n'a pas bien répondu sur le milieu contenant de l'huile d'olive.

Les résultats sont représentés comme suivant :



**Figure 26:** La croissance fongique de *Penicillium sp 4* sur les différents milieux Cz.T, Cz 1%P et Cz 1%H.



**Figure 27:** Courbes représentant l'évolution de la croissance fongique de *Penicillium sp 4* sur les différents milieux.

Les courbes obtenues pour *Penicillium sp 4* représentent une meilleure croissance parmi toutes les souches testées. On constate que cette souche a bien poussé sur les différents milieux et elle a pu dégrader les différentes sources de carbone.

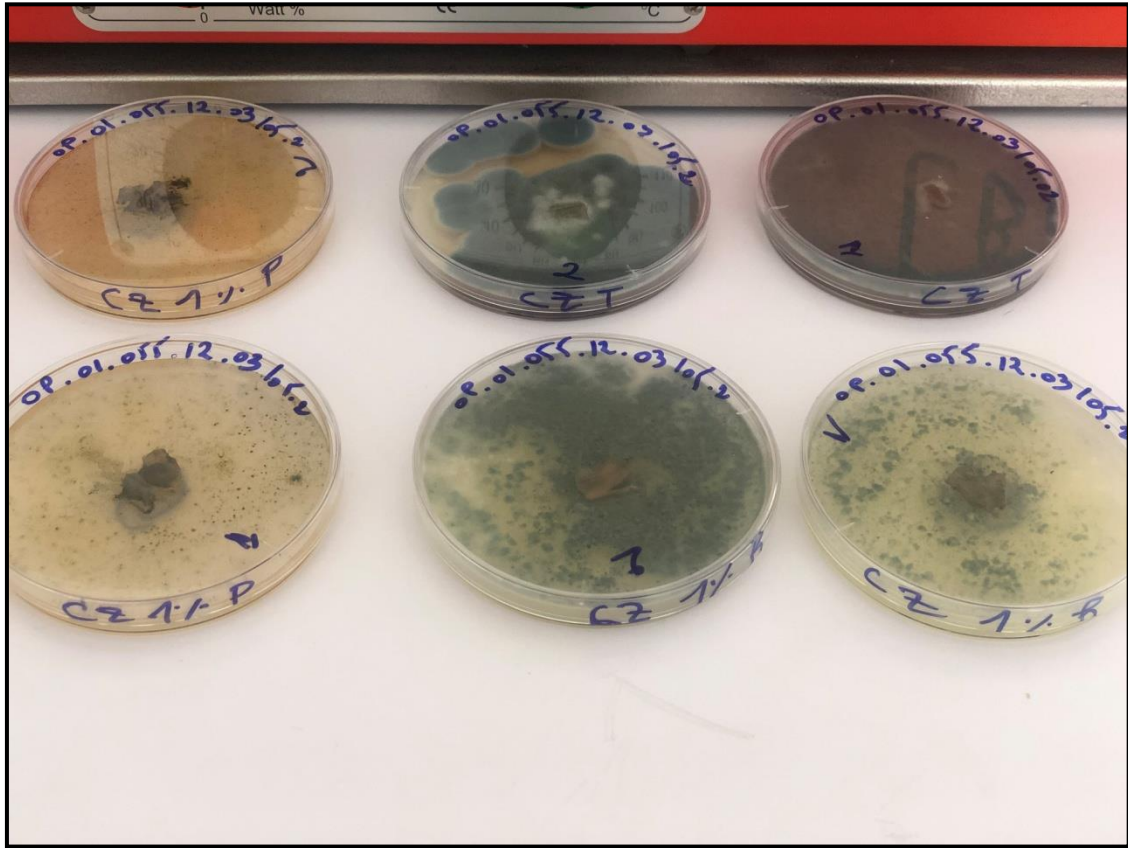


Figure 28 : La croissance fongique de *Penicillium chrysogenum* sur les différents milieux.

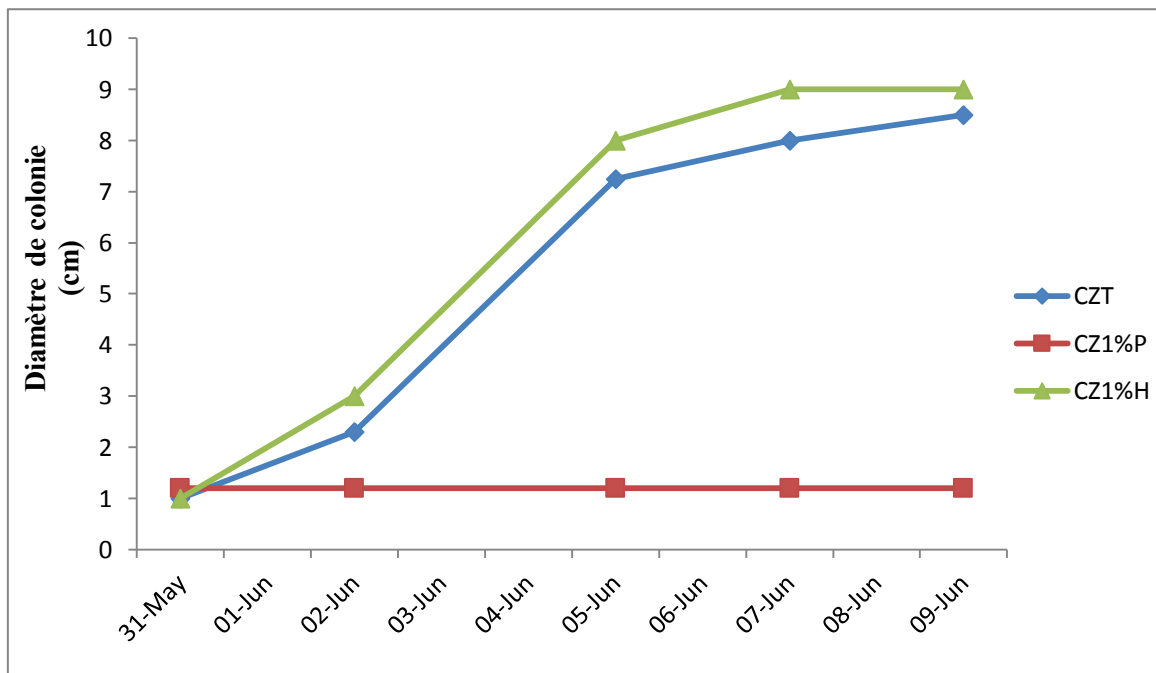
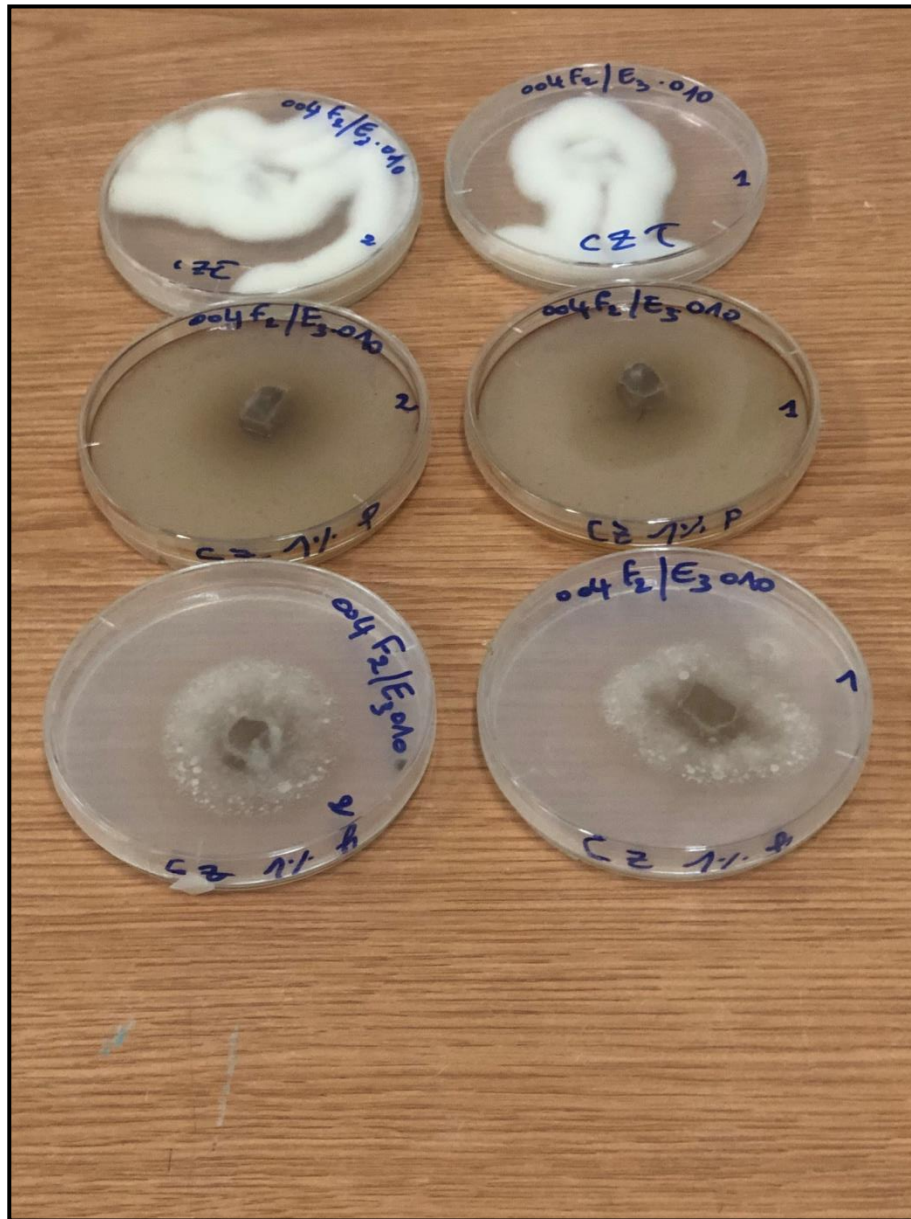
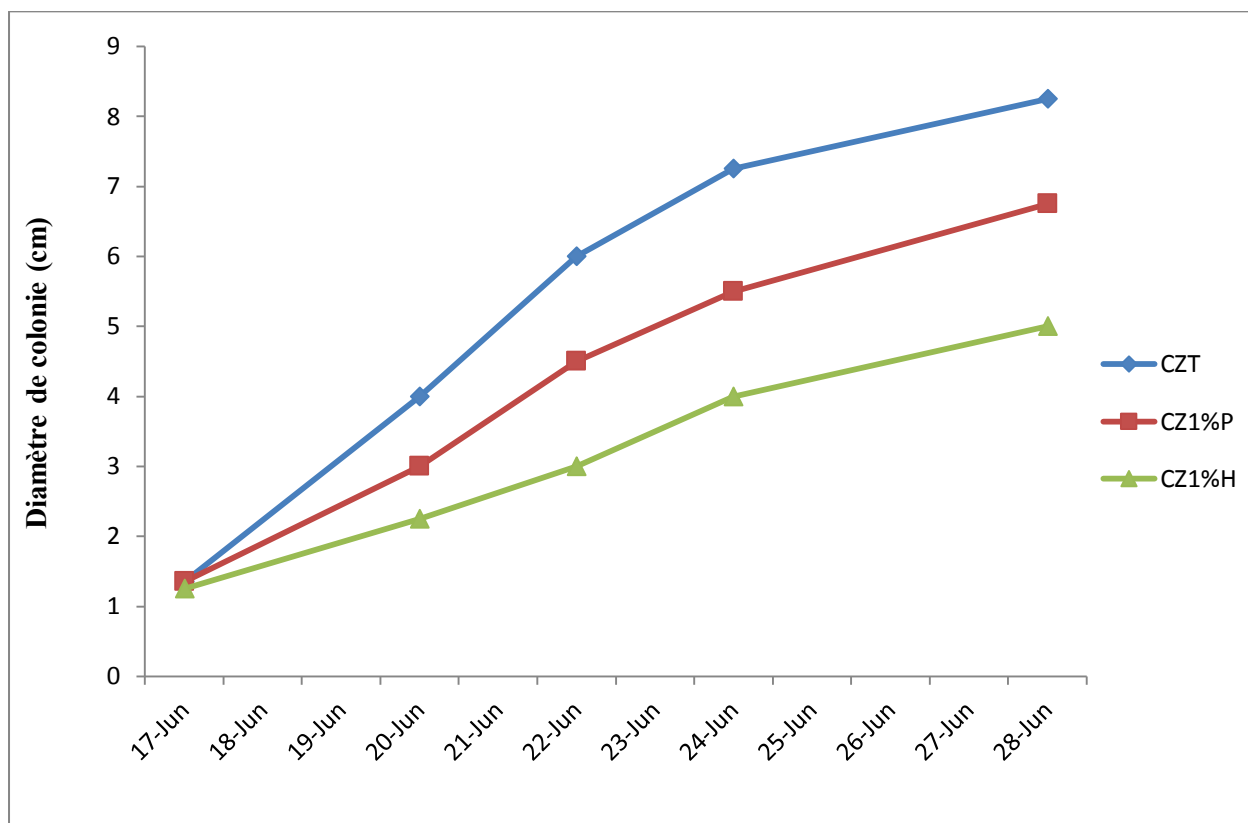


Figure 29: Courbes représentant l'évolution de la croissance fongique de *Penicillium chrysogenum* sur les différents milieux.

D'après les courbes obtenues, l'espèce *Penicillium chrysogenum* a poussé sur les milieux contenant le sucrose et l'huile d'olive comme source de carbone, cependant elle n'a pas réussi à dégrader le pétrole.



**Figure 30:** la croissance fongique de souche *Trichoderma sp* sur les différents milieux.



**Figure 31** : Courbes représentant l'évolution de la croissance fongique de la souche *Trichoderma sp* sur les différents milieux.

Les courbes obtenues montrent que cette souche représente une faible dégradation de l'huile d'olive comparés à toutes les souches testées.

On conclue que les résultats obtenus montrent une différence de croissance pour les souches fongiques dans les 3 milieux de cultures. En effet, nous avons pu constater que le diamètre de croissance des colonies varie selon la source de carbone du milieu de culture et on a remarqué que l'huile d'olive reste une source de carbone plus assimilable que le pétrole pour l'ensemble des souches fongiques testées.

### III.4 Criblage des souches fongiques pour la production de biosurfactant

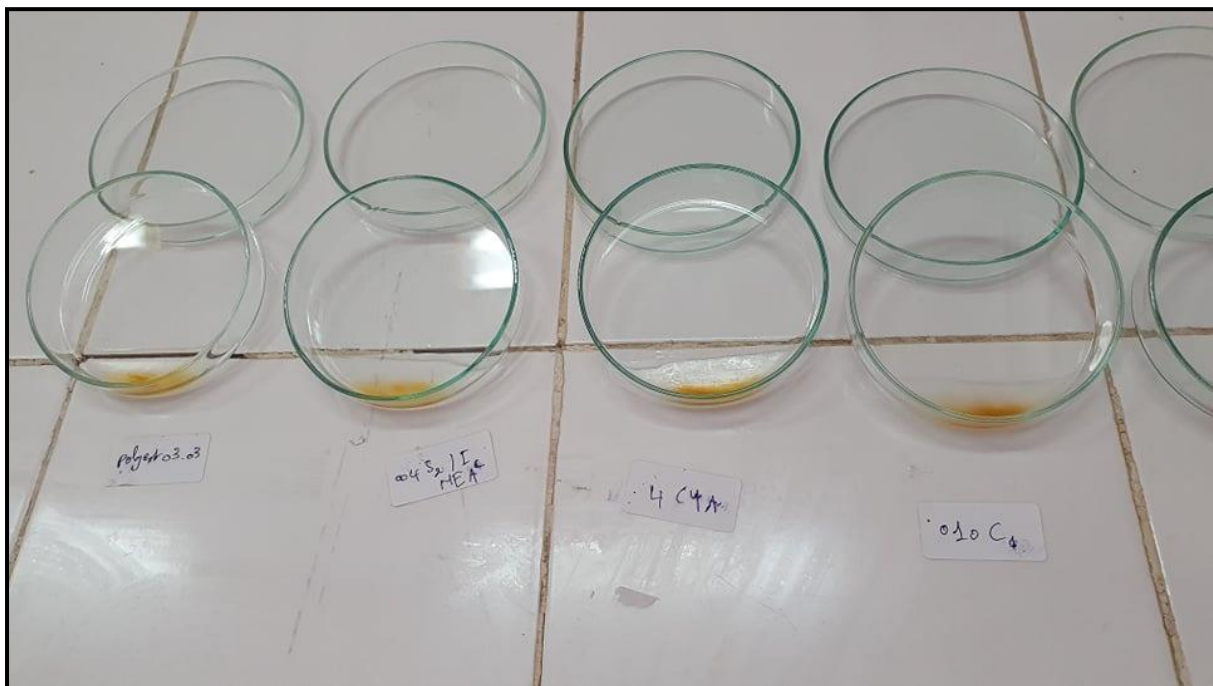
#### III.4.1 Tests préliminaires de la production de biosurfactants

Trois tests ont été effectués afin d'identifier le type de biosurfactants : le test de phénol ( $H_2SO_4$ ), le test de biuret et le test de phosphate, à partir des filtrats issus de 29 souches fongiques.

##### III.4.1.1 Phénol : la méthode de l'acide sulfurique

Le test a donné des résultats positifs sur tous les filtrats avec l'apparition d'une couleur orange indiquant la production de glycolipides. (Cf.Figure 32)

Nos résultats sont en accord avec ceux obtenus par REVATHI SUCHMA *et al.*, (2018), qui ont utilisé le médium agar Sabouraud comme milieu de fermentation, ainsi que ceux de BALEH et TAIFOUR (2020) sur le milieu Czapek et YEPD.



**Figure 32:** Résultats du test de phénol.

#### III.4.1.2 Test de Biuret

Après l'ajout de NaOH et CuSO<sub>4</sub> aux filtrats fongiques, un virage de couleur vers le violet a été observé pour tous les filtrats. Cela indique que les isolats ont une capacité de production de biosurfactants de nature lipopeptidique. (Cf.Figure 33)

Nos résultats sont en accord avec ceux obtenus par REVATHI SUCHMA *et al.*, (2018), qui ont utilisé le médium agar Sabouraud comme milieu de fermentation, ainsi que ceux de BALEH et TAIFOUR (2020) sur le milieu Czapek et YEPD.



**Figure 33** : Mise en évidence de la production du biosurfactant de type lipopeptide.

#### III.4.1.3 Test du phosphate

Après l'ajout de quelques gouttes de molybdate d'ammonium à 5% aux filtrats fongiques contenant 10 gouttes de HNO<sub>3</sub> à 6M, un précipât de couleur jaune a été observé pour toutes les souches. Cela indique la présence de phospholipides. (Cf.Figure 34-Page 61).

Les résultats obtenus sont en concordance avec ceux obtenu par REVATHI SUCHMA et *al.*, (2018), ainsi que ceux de BALEH et TAIFOUR (2020) sur le milieu Czapek et YEPD.

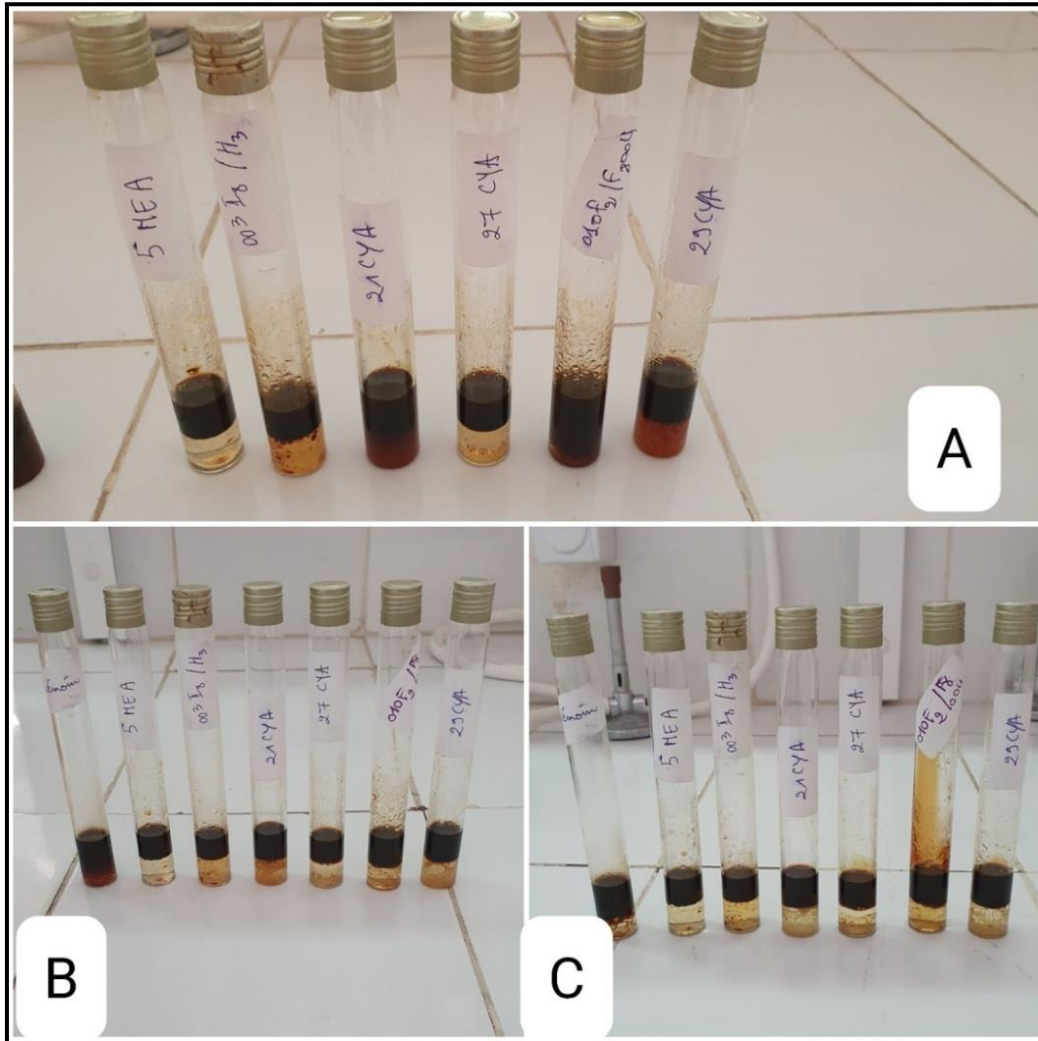


**Figure 34** : Résultats du test de phosphate.

### III.4.2 Tests de confirmation de production des biosurfactants

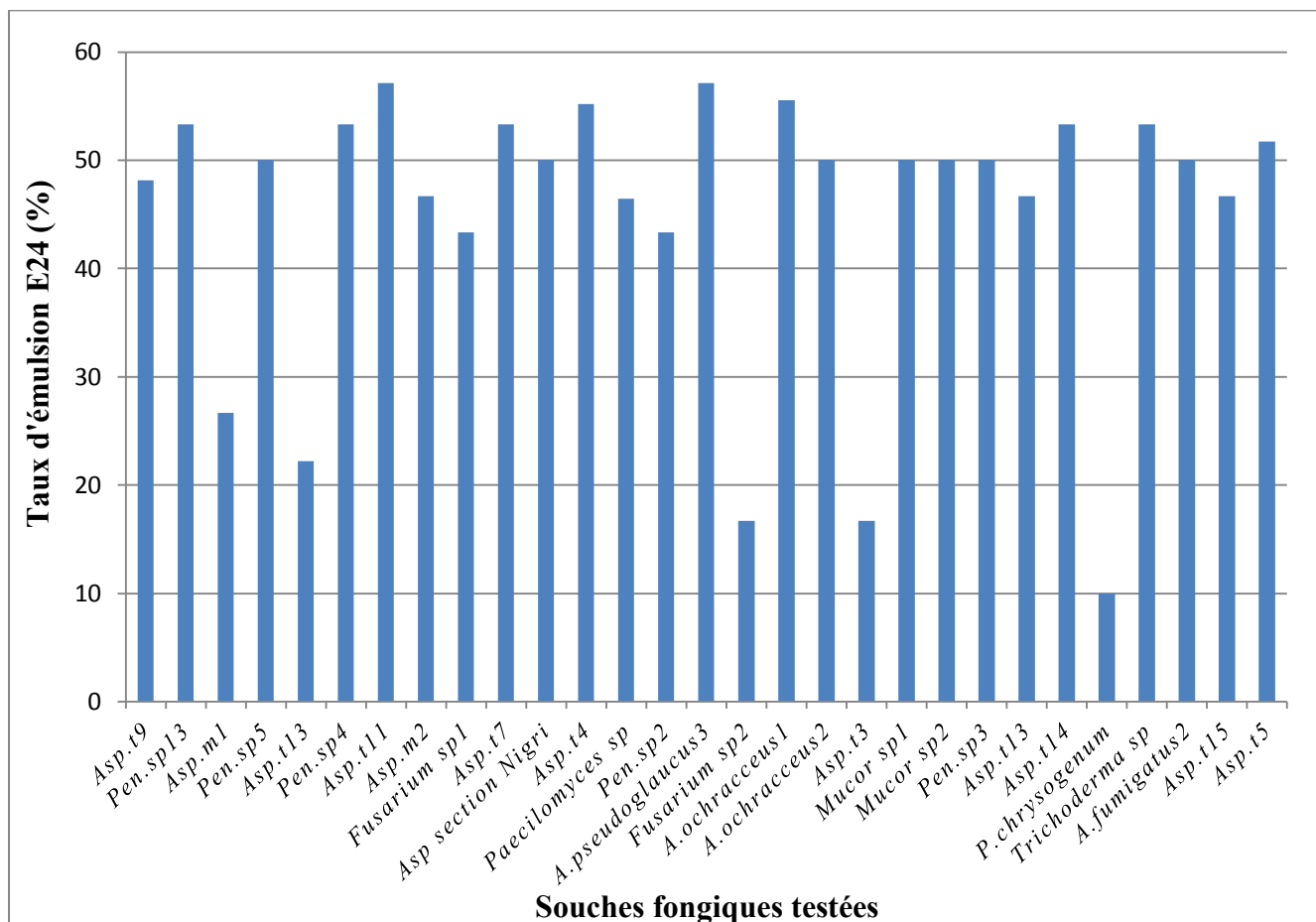
#### III.4.2.1 Indice d'émulsification

A fin de confirmer et d'estimer la production des biosurfactants par les souches testées, nous avons réalisé le test d'émulsification (Cf. Figure 35).



**Figure 35 :** Indice d'émulsification des souches étudiées : (A) : avant incubation ; (B) : après 24h d'incubation ; (C) : après 7jours d'incubation.

Les résultats obtenus de cette étude sont représentés comme suivant :



**Figure 36 :** Histogramme représentant l'estimation du taux d'émulsion du pétrole après 24 heures.

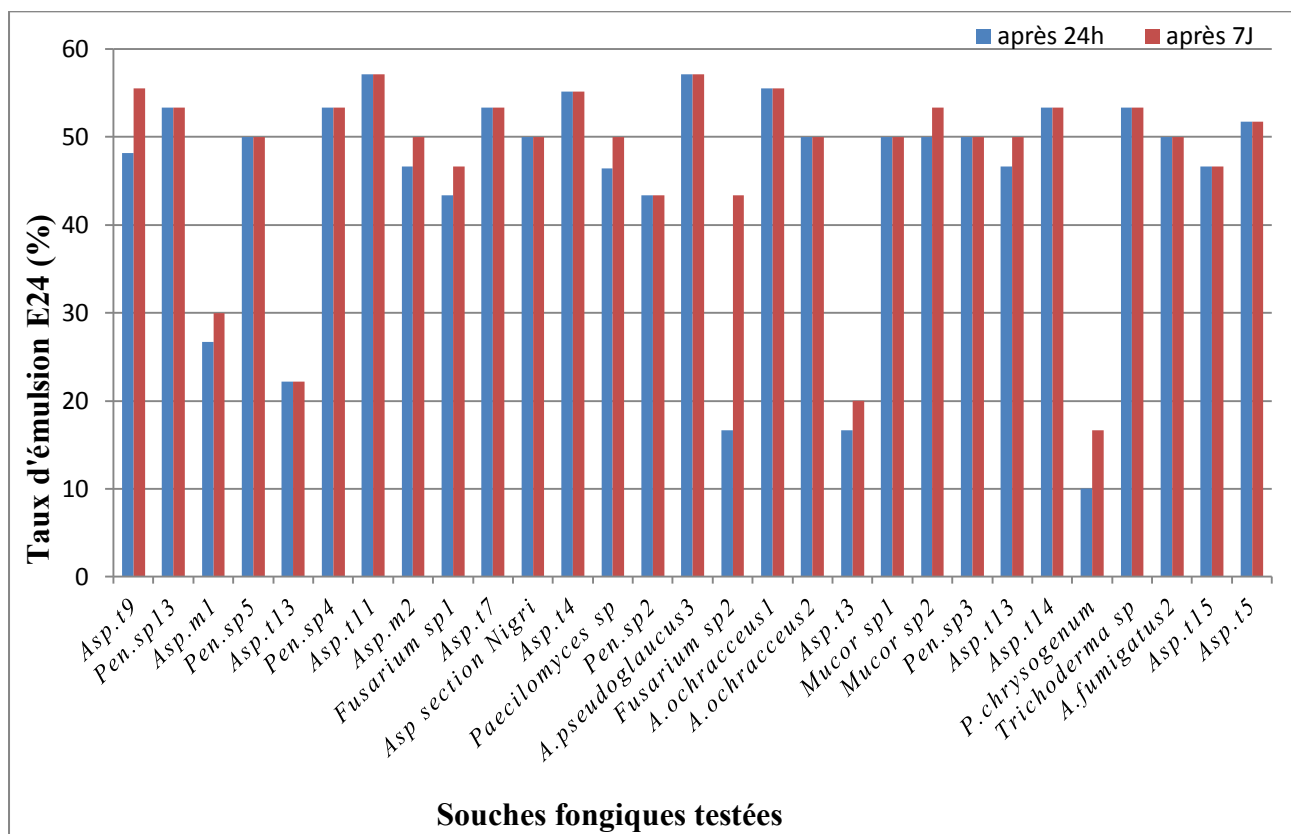
Les résultats obtenus après 24 heures indiquent que toutes les souches fongiques testées produisent du biosurfactant avec un indice d'émulsification variable.

Le taux d'émulsification le plus élevé a été observé pour les souches suivantes : *Aspergillus pseudoglaucus3*, *Aspergillus terreus* 11 avec un pourcentage de **57%**. Tandis que le taux d'émulsification le plus faible a été observé pour la souche *Penicillium chrysogenum* avec un pourcentage de **10%**.

En revanche le taux d'émulsification des autres souches varie entre **17 % et 55 %**.

Toutes les souches ont formé des émulsions partielles.

Après 7 jours d'incubation à température ambiante les résultats sont représentés dans la figure 37 page 64:



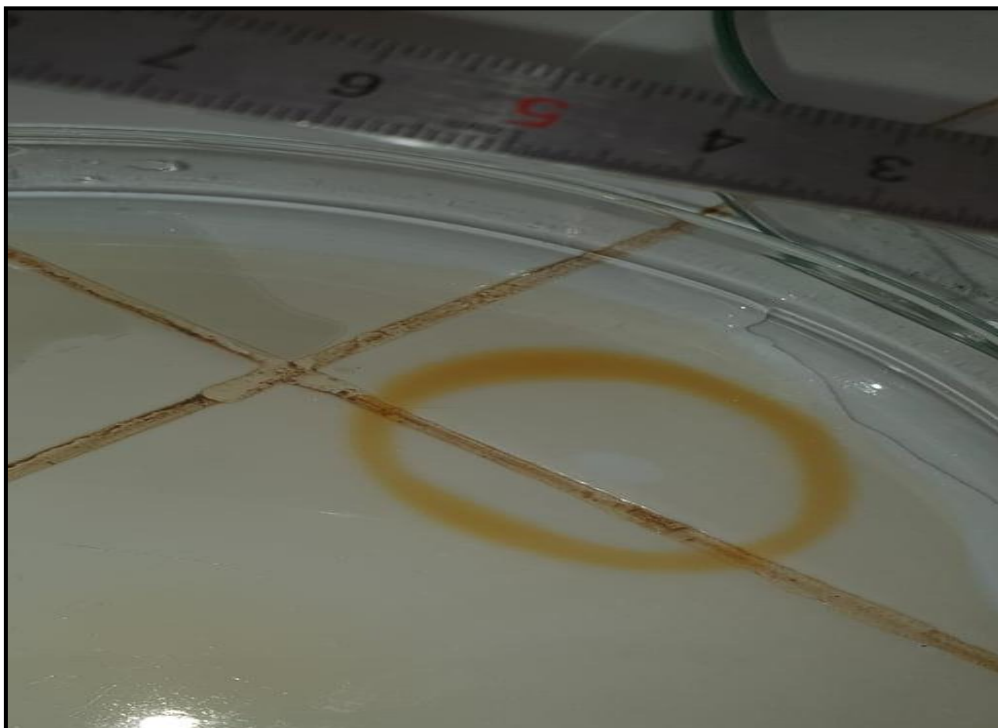
**Figure 37 :** Histogramme représentant l'estimation du taux d'emulsion du pétrole après 7 jours d'incubation.

Les résultats de l'indice d'emulsification obtenus après 7 jours sont comparés à ceux après 24 heures ; on remarque une augmentation pour les souches : (*A.terreus3* ; *A.terreus9* ; *A.terreus13* ; *A.melleus1* ; *A.melleus2* ; *Fusarium sp 1* ; *Paecilomyces sp* ; *Mucor sp 2* ; *P.chrysogenum*). Avec une augmentation remarquable a été observé pour la souche *Fusarium sp 2*. Cependant le taux d'emulsification reste stable pour les autres souches.

On conclue que la totalité des souches testées produisent du biosurfactant et ont la capacité de dégrader le pétrole utilisé.

#### III.4.2.2 Test de déplacement d'huile

La présence d'une réaction positive a été observée par le déplacement d'huile et la formation d'une zone claire. Les résultats obtenus montrent que tous les filtrats testés ont généré des zones de déplacement d'huile. (Cf.Figure 38 –Page 65)



**Figure 38 :** Test de déplacement d'huile (*Aspergillus ochraceus*2)

Les diamètres mesurés varient entre 1 cm et 5,33 cm, la souche *Penicillium sp 13* présente un diamètre de 5,33 cm, c'est le plus élevé, donc c'est la souche la plus apte à produire de biosurfactant. Par ailleurs, *Aspergillus terreus 7* présente un diamètre de 1 cm, le plus faible par rapport aux autres souches présentant un résultat positif.

#### III.4.2.3 Méthode de drop collapse

Les différentes souches testées ont montré des résultats positifs, c'est-à-dire on note l'effondrement de la goutte du pétrole. Parmi ces dernières (*Penicillium sp3*, *Penicillium sp5*, *Penicillium sp 14*, *Penicillium chrysogenum*, *Aspergillus ochraceus 1*, *Aspergillus ochraceus 2*, *Aspergillus melleus 2*, *Aspergillus terreus 3*, *Aspergillus terreus 4*, *Aspergillus terreus 5*, *Aspergillus terreus 11* , *Aspergillus terreus 12* , *Aspergillus terreus 13*, *Aspergillus section Nigri* , *Aspergillus pseudoglaucus3*, *Mucor sp 2*, *Aspergillus fumigatus 2*, *Paecilomyces sp*) qui ont montré une dispersion vis-à-vis de la goutte du pétrole ajoutée .Cependant certaine souches telle que (*Penicillium sp2*, *Penicillium sp4*, *Penicillium sp13*, *Aspergillus terreus 7*, *Aspergillus terreus 9*, *Aspergillus terreus 14*, *Aspergillus terreus 15*, *Aspergillus melleus 1*, *Fusarium sp1*, *Fusarium sp2*, *Mucor sp1*, *Trichoderma sp*) ont montré des résultats négatif, aucun changement n'a été observé et les gouttes sont restées bombées ce qui montre l'absence de biosurfactant (Cf.Figure 39 – Page 66).

Le principe de ce test se détermine par la déstabilisation des gouttelettes liquides par les tensioactifs. Par conséquent, des gouttes d'une suspension cellulaire ou de surnageant de culture sont placées sur une surface solide enduite de pétrole. Si le liquide ne contient pas de tensioactifs, les molécules d'eau polaires sont repoussées de la surface hydrophobe et les gouttes restent stables. Si le liquide contient des tensioactifs, les gouttes s'étalent voire s'effondrent car la force ou la tension interfaciale entre la goutte de liquide et la surface hydrophobe est réduite. La stabilité des gouttes dépend de la concentration en surfactant et est corrélée à la tension superficielle et interfaciale (JAIN et *al.*, 1991).



**Figure 39** : Résultat du test de drop collapse de quelques filtrats fongiques.

#### **III.4.2.4 Test de Parafilm**

La totalité des filtrats fongiques testés ont montré des résultats négatifs (Cf. Figure 40 – Page 67). L'effondrement de la goutte est toujours déterminé par la présence de biosurfactant dans le filtrat utilisé.

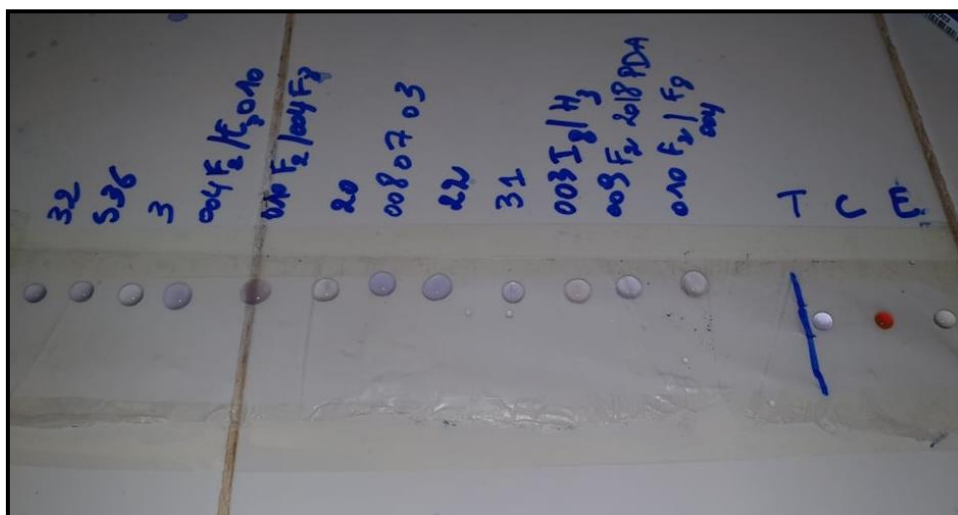


Figure 40 : Résultats du test de Parafilm.

D'après les résultats obtenus dans les tests précédents, on constate que la majorité des souches criblées ont pu facilement dégrader le pétrole brut.

Selon DAVIES et WESTLAKE (1979), les champignons présentent une très grande diversité et l'adaptabilité de l'utilisation de différentes molécules organiques en tant que source de carbone mais leur capacité à dégrader un hydrocarbure spécifique en tant que source d'énergie et / ou de la biomasse peuvent être différentes. La composition chimique d'un pétrole brut peut également être un facteur dans la détermination du type de champignons, qui peuvent le dégrader.

### III.5 Sélection des souches toxigènes

#### III.5.1 Test d'hémolyse

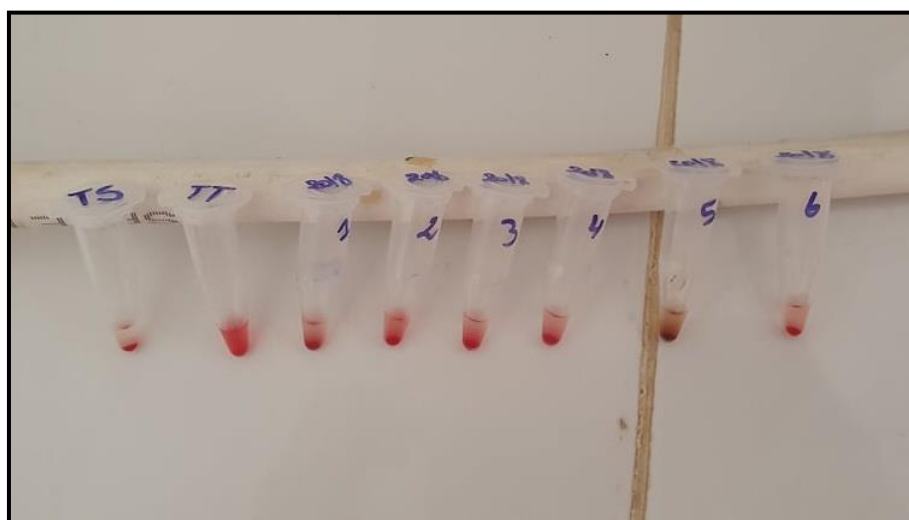


Figure 41 : Résultats du test d'hémolyse.

Les résultats du test d'hémolyse sont réunis dans le tableau 8:

**Tableau 8:** Résultats du test d'hémolyse.

référence	Genre	CMA mg/ml
S35-34 03.03-2 MEA	<i>Aspergillus</i>	0,625
009F2-2018/5 PDA	<i>Penicillium</i>	0,156

Selon SALLENAVE (1999), l'activité hémolytique est exprimée par la CMA (Concentration Minimale Active), qui est la concentration la plus faible entraînant une hémolyse (partielle ou totale), elle est exprimée en mg/ml.

En comparant les résultats obtenus pour d'autres types d'extraits provenant du milieu marin, sont considérés comme réellement hémolytiques, ceux qui ont une CMA ~ 1,25 mg/ml (BOURGET et *al*, 1988).

La souche dont la CMA est de 0,156 mg/ml appartient au genre *Penicillium*, c'est la souche la plus active détectée par ce test.

Les deux filtrats testés produisent du biosurfactant (d'après les tests de production de biosurfactant effectués), de ce fait l'utilisation de ces souches dans la production du biosurfactant destinés surtout à l'usage pharmaceutique, cosmétique et alimentaire doit être contrôler du fait qu'elles possèdent des activités hémolytiques, donc il faut utiliser des réacteurs qui limitent le passage de la toxine dans les biosurfactants.

### **III.6 Méthode de confrontation directe**

Après 4 jours d'incubation, les résultats obtenus ont montré que le diamètre calculé de la souche inhibitrice reste inférieure à la souche testée, sauf exceptionnellement pour l'espèce *Aspergillus ochraceus* 2, où on remarque un diamètre inférieur à celui de la souche inhibitrice (Cf.Tableau 9, Cf.Figure 42 – Page 69). On conclue que la souche considérée comme inhibitrice a un pouvoir inhibiteur qui peut s'exercer uniquement sur la croissance de certaines souches testées.

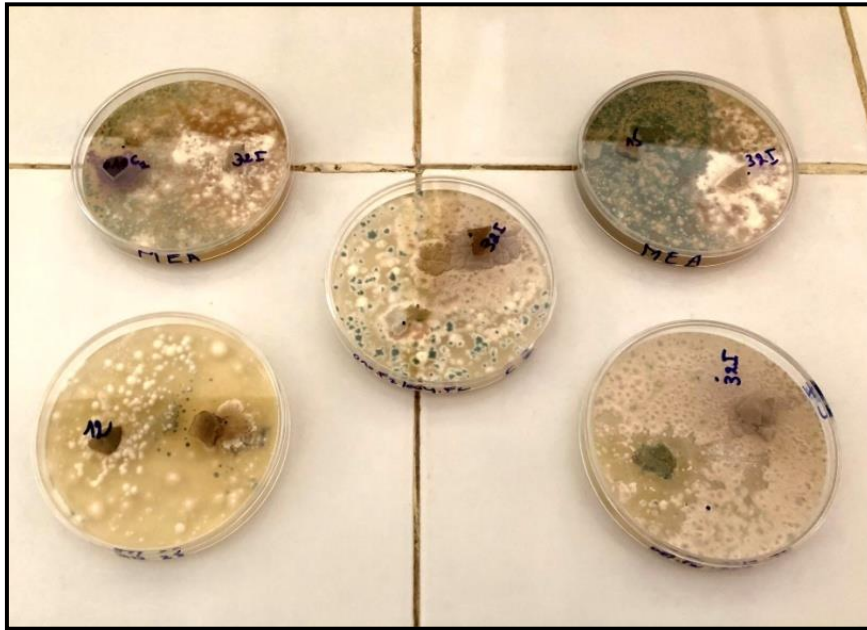


Figure 42 : Test de confrontation de quelques souches fongiques.

Tableau 9 : Le diamètre calculé pour le test de confrontation directe.

Diamètre de la souche inhibitrice	Diamètre des souches testées
3.7 cm	<i>P.roqueforti</i> : 5 cm
4.5 cm	<i>A.ochraceus</i> 2: 3.5 cm
3.3 cm	<i>A.tamari</i> 2: 5 cm
2.3 cm	<i>Penicillium.sp11</i> : 5.7 cm
2.7 cm	<i>A.terreus</i> 16: 5.5cm

# *Conclusion*

Notre travail a mené sur l'étude et l'identification des champignons filamenteux principalement ceux appartenant aux genres *Aspergillus* et *Penicillium* isolés du port d'Alger, conservées dans la mycothèque de l'ENSSMAL au LBCM1, à partir du sédiment profond, de l'eau de mer, de débris et d'organismes marins (moules, oursins). Ainsi la détermination de leur pouvoir à dégrader le pétrole brut, et leur capacité à produire des biosurfactants. Les résultats obtenus ont montrés que :

La culture monosporique OSMAC nous a permis d'identifier et de caractériser huit espèces actives appartenant aux genres *Aspergillus* et *Penicillium*. Ainsi que leur vitesse de croissance dans les différents milieux de cultures utilisés à savoir (PDA, MEA, CYA, CYAs, Czapek, et GN25).

Un suivi de la vitesse de la croissance des micromycètes de huit jours a été réalisé en utilisant des milieux avec différentes sources de carbone (sucrose, pétrole et l'huile d'olive à 1%). Cela a révélé que le sucrose et l'huile d'olive restent les sources les plus assimilables par les souches fongiques testées.

La réalisation des tests chimiques (test de phénol, test de biuret et test de phosphate), nous a permis de déterminer la nature des biosurfactants : glycolipidique, lipopeptidique et phospholipidique, produit par les différents filtrats fongiques appartenant aux genres *Aspergillus* et *Penicillium*.

D'autres tests : l'indice d'émulsification E<sub>24</sub>, déplacement d'huile, drop collapse et parafilm M, ont été réalisé pour confirmer la production de biosurfactant.

Les souches les plus productrices de biosurfactant sont *Aspergillus pseudoglaucus* 3 et *Aspergillus terreus* 11 avec un pouvoir émulsifiant de 57%. Pour le test de déplacement de pétrole la souche *Penicillium sp* 13 présente un diamètre de 5,33 cm (c'est le plus élevé), avec un E<sub>24</sub>=53,33%

L'ensemble des résultats obtenus ont montré la capacité des micromycètes filamenteux à biodégrader les hydrocarbures.

D'autre part le test d'hémolyse sur hématie humaine nous a permis de déterminer le pouvoir toxigène de deux souches fongiques *Aspergillus ochraceus* et *Penicillium sp* 13 avec une valeur de 0,156mg/ml a été enregistré pour cette dernière.

A la lumière des résultats collectés, il est très souhaitable de compléter cette étude par des approches plus approfondies, à savoir:

- Une approche moléculaire pour confirmer l'identité des souches fongiques étudiées.
- La multiplication des études de l'influence des différentes sources de carbone sur la vitesse de croissance des micromycètes.
- Etudier l'influence des conditions environnementales (pH, température, ...etc.) sur la production des biosurfactants.
- Exploitation de la production des biosurfactants dans des bioréacteurs à grande échelle puisqu'ils ont prouvé leur efficacité dans la bioremédiation des zones pollués par les hydrocarbures.

*Références  
bibliographiques*

**-A-**

**ABDEL-MAWGOD A.M., STEPHANOPOULOUS G. (2018).** Simple glycolipids of microbes: chemistry, biological activity and metabolic engineering [en ligne]. *Synthetic and Systems Biotechnology*. 3:3–19. [Consulté le 16/05/2021]. Disponible sur le web: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2405805X17300972>

**ABOUSEOUD MAHMOUDE et al., (2008).** Evaluation of different carbon and nitrogen sources in production of biosurfactant by *Pseudomonas fluorescens* [en ligne]. *Desalination*, 223:143-151. [Consulté le 23/09/2021]. Disponible sur le web : <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0011916407008478#>

**ATLAS R.M. and BARTHA R. (1992).** Hydrocarbon Biodegradation and Oil Spill Bioremediation [en ligne]. *Advances in Microbial Ecology*. 12:287–338. [Consulté le 30/04/2021]. Disponible sur le web: [https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4684-7609-5\\_6](https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4684-7609-5_6)

**-B-**

**BADILLET G., BRIEVE C. et al. (1987).** Champignons contaminants des cultures, champignons opportunistes [en ligne]. *Atlas clinique et biologique*, vol II, Paris : Ed VARIA, [Consulté le 23/08/2021]. Disponible sur le web : [https://scholar.google.fr/scholar?hl=fr&as\\_sdt=0%2C5&q=Champignons+contaminants+des+cultures%2C+champignons+opportunistes%2C+Atlas+clinique+et+biologique%2C+vol+II%2C+Ed+VARIA%2C+Paris&btnG=](https://scholar.google.fr/scholar?hl=fr&as_sdt=0%2C5&q=Champignons+contaminants+des+cultures%2C+champignons+opportunistes%2C+Atlas+clinique+et+biologique%2C+vol+II%2C+Ed+VARIA%2C+Paris&btnG=)

**BANAT I. (2000).** Les biosurfactants plus que jamais sollicités [en ligne]. *Biofutur, mensuel Européen de biotechnologie*. 2000 :44-47. [Consulté le 02/08/2021]. Disponible sur le web : <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0294350600887918>

**BANAT M., MAKKAR R.S. et al. (2000).** Potential commercial applications of microbial surfactants[en ligne]. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 53 : 495-508. [Consulté le 08/06/2021]. Disponible sur le web : <https://link.springer.com/article/10.1007/s002530051648>

**BARBIER E.B. (2017).** Marine ecosystem services[en ligne]. *Current Biology*. 27: R507-R510. [Consulté le 01/09/2021]. Disponible sur le web : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960982217302890>

- BAR-HEN A., MARIADASSOU M. et al. (2008).** Influence function for robust phylogenetic reconstructions[en ligne]. *Molecular Biology and Evolution*. 25:869-873. [Consulté le 10/07/2021]. Disponible sur le web : <https://academic.oup.com/mbe/article/25/5/869/1198896>
- BARNETT H.L., HUNTER B.B. (1972).** Illustrated genera of imperfect fungi. 3<sup>ème</sup>Ed. Minneapolis : Burgess Publishing Company, p241.
- BASTIEN-VENTURA C., GIRIN M. et al. (2005).** Marées noires et environnement. Collection Propos, Institut Océanographique Paris, p407.
- BEIRAS R. (2018).** Sources, Fate and Effects of Pollutants in Coastal Ecosystem. *Marine Pollution*.107-135
- BENMESSOUD N. (2010).** Biodiversité fongique du sable de quatre plages (Beau Séjour, Eden, les Andalouses, et Madagh) du Littoral ouest algérien [en ligne]. Mémoire de Magister, Université d'Oran. [Consulté le 27/06/2021]. Disponible sur le web : <https://theses.univ-oran1.dz/document/TH3291.pdf>
- BLACKWELL M., VILGALYS R. et al. (1998).** Fungi, Eumycota. *In The Tree of Life*, D.R. Maddison and W.P. Maddison editor, University of Arizona.
- BLASIG R., SCHUNCK W.H. et al. (1984).** Degradation of long-chain n-alkanes by the yeast *Ledderomyces elongisporus*. I. Products of alkane oxidation in whole cells. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 19: 241-246.
- BLUNT J.W., CARROLL A.R. et al. (2018).** Marine natural products[en ligne]. *Nat Prod Rep*. 35:8–53. [Consulté le 20/05/2021]. Disponible sur le web : <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29335692/>
- BLUNT J.W., COPP B.R. et al. (2016).** Marine natural products [en ligne]. *Nat Prod Rep* 32:116–211. [Consulté le 06/10/2021]. Disponible sur le web : <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2016/np/c5np00156k>
- BODOUR A.A., GERRERO-BARAJAS C. et al. (2004).** Structure and characterization of Flavolipids, a novel class of Biosurfactants produced by *Flavobacterium* sp. Strain MTN11[en ligne]. *App. and Env. Microbiol.*, 10 (6): 114-120. [Consulté le 17/09/2021]. Disponible sur le web : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC321267/>

- BOGNOLO G. (1999).** Biosurfactant as emulsifying agents for hydrocarbons [en ligne]. *Colloids and Surfaces A: Physico-Chemical and Engineering Aspects*. 152(1-2): 41-52. [Consulté le 10/08/2021]. Disponible sur le web : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0927775798006840>
- BOOTH T., KENKEL N. (1986).** Ecological studies of lignicolous marine fungi: a distribution model based on ordination and classification. In *The Biology of Marine Fungi* (ed. S.T. Moss). Cambridge University Press, Cambridge, 297-310.
- BOTTON B., BRETON A. et al. (1990).** Moisissures utiles et nuisibles importance industrielle [en ligne]. 2<sup>ème</sup> édition. Paris : Masson. *Collection Biotechnologies*. p426. [Consulté le 05/06/2021]. Disponible sur le web : <https://www.leslibraires.fr/livre/253488-moisissures-utiles-et-nuisibles-2eme-edition--bernard-botton-dunod>
- BOUCHET P.H., GUIGNARD J.L. et al. (1999).** Les champignons, Mycologie, fondamental et appliquée. Paris : Masson. p194.
- BOUDIH S. (2011).** Identification des moisissures et de leurs métabolites secondaires colonisant des supports papiers : évaluation de la toxicité sur les cellules épithéliales respiratoires in vitro [en ligne]. Thèse de Doctorat en Sciences Agricoles. Université Paris-Est. [Consulté le 22/08/2021]. Disponible sur le web : <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00781807>
- BOUDOUR A.A., DREES K.P. et al. (2003).** Distribution of biosurfactant-producing bacteria in undisturbed and contaminated arid Southwestern soils [en ligne]. *Applied Environ. Microbiol.* 69: 3280-3287. [Consulté le 19/08/2021]. Disponible sur le web : <https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/AEM.69.6.3280-3287.2003>
- BOURGET G., MORE M.T. et al. (1988).** Cytotoxicity and hemolysis by an extract of the sponge *Pachymatisma johnstonii*. *Toxicon*. 26 (3) : 324-327.
- BRISOU J. (1975).** La microbiologie du milieu marin: Les levures et les champignons du milieu marin. Flammarion Médicales (collection de l'institut Pasteur), Paris, 159-162, 271 p.
- BUGNI T.S., IRELAND C.M. (2004).** Marine-derived fungi: a chemically and biologically diverse group of microorganisms. *Natural Product Reports*. 21:143-163.

**-C-**

**CAO B., NAGARAJAN K. et al. (2009).** Biodegradation of aromatic compounds: current status and opportunities for biomolecular approaches. *Appl Microbiol Biotechnol.* 85:207–282.

**CERNIGLIA C.E. (1992).** Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biodegradation.* 3:351-368.

**CHABASSE D., BOUCHARA J.P. et al. (2002).** Les moisissures d'intérêt médical. Cahier de formation n° 25, Bioforma [en ligne]. 159p. [Consulté le 30/04/2021]. Disponible sur le web : <https://sjbm.fr/images/cahiers/2002-Bioforma-25-Les%20moisissures%20d'int%C3%A9ret%20m%C3%A9dical.pdf>

**CHAGNEAU C.H., MOREL J.L. et al. (1995).** Microbial degradation in soil microcosms of fuel oil hydrocarbons from drilling cuttings. *ENVIRONMENTAL SCIENCE & TECHNOLOGY.* 29:1615-1621.

**CHAPMAN P.M. (2017).** Assessing and managing stressors in a changing marine environment. *Mar. Pollut. Bull.* 124(2):587-590.

**CHERMETTE R., BUSSIERAS J. (1993).** Importance des parasites digestifs des chevaux : le point de vue des éleveurs révélé par une enquête en Normandie. Thèse de doctorat. Ecole Nationale Vétérinaire de Maisons-Alfort. France.

**CHRISTOFI N. and IVSHINA I.B. (2002).** Microbial surfactants and their use in field studies of soil remediation. *Journal of Applied Microbiology.* 93: 915-929.

**CUOMO V., PALOMBA I. et al. (1995).** Antimicrobial activities from marine fungi. *J. Mar. Biotechnol.* 2:199-204.

**-D-**

**DAVIES J.S., WESTLAKE D.W.S. (1979).** Crude oil utilization by fungi. *Can. J. Microbiol.* 25 : 146-156.

**DESAI J.D., BANAT I.M. (1997).** Microbial Production of Surfactants and their commercial potential, *microbiol. And mol. Biol.* 61 : 47–64.

**DUROUSSET M. (1999).** Le marché du pétrole. Paris : Collection HISTEGE.

**-E-**

**ERIKSSON O.E. (1997).** Supraordinal taxa of Ascomycota. *Myconet*. 1:1-16.

**-F-**

**FENICAL W., JENSEN P. (1997).** Marine fungi : A developing focus in marine natural products chemistry. Euroconference on marine natural products ( 1;1997; Athènes) Athènes: novembre, 2-6.

**-G-**

**GARAY L.A., SITEPU I.R. et al. (2018).** Extracellular fungal polyol lipids: a new class of potential high value lipids. *Biotechnol Adv* 36:397–414.

**GARETH-JONES E.B. (1998).** Des champignons dans l’océan [en ligne]. *Biofutur*. 1998 : 18-20. [Consulté le 14/07/2021]. Disponible sur le web : <https://www.sciencedirect.com/journal/biofutur/vol/1998/issue/179>

**GROSSART H.P., SILKE V.D.W. et al. (2019).** Fungi in aquatic ecosystems. *Nature Reviews Microbiol*. 17(6):339-354.

**GUDINA E.J., et al., (2013).** Potential therapeutic applications of biosurfactants [en ligne]. *Article national center of biotechnology information* : 34(12) :667-675. [Consulté le 18/10/2021]. Disponible sur le web : <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24182625/>

**GUERGOURI I. (2010).** Caractérisation des bactéries isolées de sols contaminés par les hydrocarbures (zone de Skikda) et productrices de biosurfactants. Mémoire de magister. Université frères *Mentouri Constantine*.

**-H-**

**HAWKSWORTH D.L. (1991).** The fungal dimension of biodiversity : magnitude, signifiante and conservation. *Mycological research*.. 95:641-655.

**HAWKSWORTH D.L. (2001).** The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. *Mycological research*. 105: 1422-1432

**HAWKSWORTH D.L., ROSSMAN A.Y. (1997).** Where are all the undescribed fungi? *Phytopathology*. 87:888-891

**HAWKSWORTH D.L., SUTTON B.C. et al. (1995).** Ainsworth and Bisby's dictionary of the fungi (8th Ed.). *CAB International*, Wallingford, United Kingdom. 616p

**HEALY M.G., DEVINE C.M. et al. (1996).** Microbial production of biosurfactants [en ligne]. *Resources, Conservation and Recycling*. 18: 41-57. [Consulté le 26/09/2021]. Disponible sur le web : <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0921344996011676>

**HEIDER J., SPORMANN A.M. et al. (1999).** Anaerobic bacterial metabolism of hydrocarbons [en ligne]. *FEMS. Microbiology. Reviews*. 22:459-473. [Consulté le 28/05/2021]. Disponible sur le web : <https://academic.oup.com/femsre/article/22/5/459/497338>

**HOTA S., HOTA G. et al. (2021).** Fungal Communities for Bioremediation of Contaminated Soil for Sustainable Environments[en ligne]. *Recent Trends in Mycological Research*. p 27-42. [Consulté le 06/09/2021]. Disponible sur le web : [https://www.researchgate.net/publication/350904711\\_Fungal\\_Communities\\_for\\_Bioremediation\\_of\\_Contaminated\\_Soil\\_for\\_Sustainable\\_Environments](https://www.researchgate.net/publication/350904711_Fungal_Communities_for_Bioremediation_of_Contaminated_Soil_for_Sustainable_Environments)

**HYDE K.D., GARETH-JONES E.B. et al. (1998).** Role of fungi in marine ecosystems[en ligne]. *Biodivers. Conserv.* 7 : 1147-1161. [Consulté le 03/07/2021]. Disponible sur le web: [https://www.academia.edu/12498514/Role\\_of\\_fungi\\_in\\_marine\\_ecosystems](https://www.academia.edu/12498514/Role_of_fungi_in_marine_ecosystems)

**-I-**

**IMHOFF J.F., LABES A. et al. (2011).** Bio-mining the microbial treasures of the ocean: New natural products. *Biotechnology Advances*. 29: 468482.

**-J-**

**JAIN D., COLLINS-THOMPSON D. et al. (1991).** A drop-collapsing test for screening surfactant-producing microorganisms[en ligne]. *J Microbiol Methods*. 13(4):271–279. [Consulté le 20/06/2021]. Disponible sur le web: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/016770129190064W?via%3Dihub>

**JAMES T.Y., KAUFF F. et al. (2006).** Reconstructing the early evolution of Fungi using a six-gene phylogeny. *Nature*. 443: 818-822

**JAMES T.Y., PORTER D. et al. (2000).** Molecular phylogenetics of the Chytridiomycota supports the utility of ultrastructural data in chytrid systematic. *Canadian Journal of Botany*. 78: 336-350.

**JENNINGS D.H., LYSEK G. (1996).** Fungal biology: understanding the fungal lifestyle. Oxford : Bios Scientific publishers.

**JIN L., QUAN C. et al. (2016).** Potential Pharmacological Resources: Natural Bioactive Compounds from Marine-Derived Fungi [en ligne]. *Marine drugs*. 14(4) : 76. [Consulté le 18/05/2021]. Disponible sur le web: <https://doi.org/10.3390/md14040076>

**JONES E.B.G., PANG K.L. et al. (2019).** An online resource for marine fungi[en ligne]. *Fungal Diversity*. 96:347-433. [Consulté le 18/05/2021]. Disponible sur le web : [https://www.researchgate.net/publication/333182075\\_An\\_online\\_resource\\_for\\_marine\\_fungi](https://www.researchgate.net/publication/333182075_An_online_resource_for_marine_fungi)

**JONES E.B.G. (2011).** Fifty years of marine mycology [en ligne]. *Fungal Diversity* 50: 73-112. [Consulté le 18/05/2021]. Disponible sur le web : [https://www.researchgate.net/publication/226715116\\_Fifty\\_years\\_of\\_marine\\_mycology](https://www.researchgate.net/publication/226715116_Fifty_years_of_marine_mycology)

**JOSE F. (1999).** Essai de biodégradabilité sur les sols contaminés par les hydrocarbures, 3ème édition. *Dunad*. Paris. P 102-116.

**-K-**

**KAISER J. (2001).** Bioindicators and Biomarkers of Environmental Pollution and Risk Assessment. *Environmental Biotechnology Division*. Indian Institute of Chemical Technology

**KLICH M.A (2002).** Identification of common *Aspergillus* species. *Centraalbureau voor Schimmelcultures*, Utrecht, The Netherlands. 116p.

**KLUG M.J., MARKOVETZ K. (1971).** Utilization of aliphatic hydro-carbons by microorganisms. *Adv. Microbial Physiol*. 5: 1–39.

**KOHLMEYER J., KOHLMEYER E. (1979).** Marine Mycology: The Higher Fungi[en ligne]. New York : *Academic Press*. [Consulté le 02/05/2021]. Disponible sur le web : <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/j.1439-0485.1980.tb00224.x>

**KOHLMEYER J., KOHLMEYER E. (1995).** Decomposition of mangrove wood by marine fungi and teredinids in Belize. *Mar. Ecol*. 16 (1): 27-39.

**KOHLMEYER J. (1977).** New genera and species of higher fungi from the deep sea (1615-5315 m) [en ligne]. Univ. North Carolina, INST. MAR. SCI., MOREHEAD CITY, N.C. 28557. USA *Rev. Mycol.* 41:189-206. [Consulté le 09/09/2021]. Disponible sur le web : <https://pascal-francis.inist.fr/vibad/index.php?action=getRecordDetail&idt=PASCAL7810040369>

**KOHLMEYER J. (1983).** Geography of marine fungi [en ligne]. *Aust. J. Bot. Suppl. Ser.* 10: 67-76. [Consulté le 31/05/2021]. Disponible sur le web : <https://www.publish.csiro.au/bs/bt8310067>

**-L-**

**LANG S. and D. WULLBRANDT. (1999).** Rhamnose lipids biosynthesis–Microbial production and application potential [en ligne]. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 51: 22-32. [Consulté le 11/06/2021]. Disponible sur le web : <https://link.springer.com/article/10.1007/s002530051358>

**LARPENT J.P. (2000).** Introduction à la nouvelle classification bactérienne « Les principaux groupes bactériens». *Edition Techniques et Documentation.* 280p.

**LEAHY J.G., COLWELL R.R. (1990).** Microbial degradation of hydrocarbons in the environment [en ligne]. *Microbiological Reviews* 54: 305-315. [Consulté le 12/06/2021]. Disponible sur le web : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC372779/>

**LECELLIER A. (2013).** Caractérisation et identification des champignons filamenteux par spectroscopie vibrationnelle. Thèse de Doctorat en Sciences Technologie Santé. Biologie-Biophysique. Université de REIMS CHAMPAGNE-ADRENNE.

**LECOMTE P. (1995).** Les sites pollués, traitement des sols et des eaux souterraines. *Edition Lavoisier, TEC&DOC.* P.198.

**LEFEBVRE G. (1986).** Notions de chimie du pétrole. *Editions TECHNIP,* 1232 pages.

**LIBERRA K., LINDEQUIST U. (1995).** Marine fungi – A prolific resource of biologically active natural products [en ligne]. *Pharmazie,* 50: 583- 588. [Consulté le 19/08/2021]. Disponible sur le web : <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7480092/>

**LUI HAOJING et al., (2016).** Foliar penetration enhanced by biosurfactant rhamnolipid [en ligne]. *Colloids Surf. B Biointefaces*, 145 : 548-554. [Consulté le 11/06/2021]. Disponible sur le web : <https://europepmc.org/article/med/27281240>

**LUISETTI M., PICCIONI P.D. et al. (1991).** Some properties of the alkaline proteinase from *Aspergillus melleus*. *Int J Tissue React.* 13: 187-192.

**-M-**

**MAAMAR A., LUCCHESI M. et al. (2020).** Highlighting the Crude Oil Bioremediation Potential of Marine Fungi Isolated from the Port of Oran (Algeria) [en ligne]. *Diversity*. 12(196). [Consulté le 22/05/2021]. Disponible sur le web : <https://www.researchgate.net/publication/341399874>

**MAMMAR A. (2015).** Etude de la biodégradation du pétrole brut par le peuplement fongique du port d'Oran. Mémoire de Magister. Sciences de l'Environnement marin. Université d'Oran.

**MARCHANT R., BANAT I.M. (2018).** Biosurfactants: a sustainable replacement for chemical surfactants? *Biotechnol Lett.* 34:1597–1605.

**MATA-SANDOVAL J.C., KARNS, J. et al. (2000).** The influence of surfactants and biosurfactants on the bioavailability of hydrophobic organic pollutants in subsurface environments. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental.* 16(4).

**MEULENBERG R., RIJNAARTS H.H.M. et al. (1997).** Partially oxidized polycyclic aromatic hydrocarbons show an increased bioavailability and biodegradability. *FEMS Microbiology letters.* 152: 45-49.

**MORIKAWA M., DAIDO H. et al. (1993).** A new lipopeptide biosurfactant produced by *Arthrobacter sp.* strain MIS38 [en ligne]. *Journal of Bacteriology.* 175(20) : 6459-6466. [Consulté le 25/05/2021]. Disponible sur le web : [https://www.researchgate.net/publication/14791131\\_A\\_New\\_Lipopeptide\\_Biosurfactant\\_Produced\\_by\\_Arthrobacter\\_sp](https://www.researchgate.net/publication/14791131_A_New_Lipopeptide_Biosurfactant_Produced_by_Arthrobacter_sp)

**MORIN O. (1994).** *Aspergillus* et aspergilloses: biologie [en ligne]. Paris : Techniques Encyl. Med. Chir. Elsevier. *Maladies infectieuses* 8-600-A-10. [Consulté le 17/06/2021]. Disponible sur le web : [https://scholar.google.com/scholar?hl=fr&as\\_sdt=0%2C5&q=MORIN+O.+%281994%29.+A](https://scholar.google.com/scholar?hl=fr&as_sdt=0%2C5&q=MORIN+O.+%281994%29.+A)

[spergillus+et+aspergilloses%3A+biologie+%5Ben+ligne%5D.+Paris+%3A+Techniques+Encyl.+Med.+Chir.+Elsevier.+Maladies+infectieuses+8-600-A-10.+&btnG=](#)

**MUKHERJEE A.K., DAS KISHORE (2010).** Microbial surfactants and their potential applications: An overview [en ligne]. In *Biosurfactants*. P54-55: Indian Institute of Technology Kharagpur India. Ramkrishna Sen. [Consulté le 18/06/2021]. Disponible sur le web : <https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4419-5979-9-4>

**-N-**

**NOONIM P., MAHAKARNCHANAKUL W. et al. (2008).** Isolation, identification and toxigenic potential of ochratoxin A-producing *Aspergillus* species from coffee beans grown in two regions of Thailand [en ligne]. *Intern J Food Microbiol.* 128(2): 197-202. [Consulté le 13/09/2021]. Disponible sur le web : <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18819720/>

**-O-**

**OOIKE M., NOZAWA K. et al. (1997).** Bisindolylbenzenoids from ascostromata of *Petromyces muricatus* [en ligne]. *Can J Chem*, 75:625-628. [Consulté le 02/09/2021]. Disponible sur le web : <https://cdnsiencepub.com/doi/pdf/10.1139/v97-075>

**-P-**

**PANG K.L., GARETH-JONES E.B. et al. (2004).** Two new marine fungi from China and Singapore, with the description of a new genus, *Sablecola* (Halosphaerales, Ascomycota) [en ligne]. *Can. J. Bot.* 82: 485-490. [Consulté le 04/09/2021]. Disponible sur le web : <https://www.researchgate.net/publication/237154946>

**PEBERDY J.F. (1985).** Biology of *Penicillium*. In: Biology of Industrial Microorganisms. Demain, A.L. and Solomon, N.A., Eds. *The Benjamin/Cummings Pub. Co., Inc.* London; Amsterdam; Don Mills, Ontario; Sydney; Tokyo. pp. 407-431.

**PITT J.I. (1979).** The genus *penicillium* and its teleomorphic states *Eupenicillium* and *Talaromyces* [en ligne]. *Academic Press, London, U.K.* 324 p. [Consulté le 12/09/2021]. Disponible sur le web : <https://www.scienceopen.com/document?vid=ff8a672e-bae5-4d27-a5e3-1cec6dc32906>

**PITT J.I. (1988).** A laboratory guide to common *Penicillium* species (2nd ed.). *Commonw Scientif Ind Research Organisation.* North Ride Australia, 197 p.

**POLGLASE J.L., ALDERMAN D.J. et al. (1986).** Aspects of the progress of mycotic infections in marine animals, *In: Moss ST (ed) The biology of marine fungi:* Cambridge University Press, Londres, 155-164.

**-R-**

**RAGHUKUMAR C. (2000).** Fungi from marine habitats: an application in bioremediation. *Mycological research* 104: 1222-1226

**RENFRO TAYLER DILLARD et al., (2014).** Rhamnolipid surface thermodynamic properties and transport in agricultural soil [en ligne]. *Colloids Surf. B Biointerfaces*, 115 :317-322. [Consulté le 20/06/2021]. Disponible sur le web : <https://europepmc.org/article/med/24394947>

**REVATHI-SUSHMA K., SAI KIRANMAI G. et al. (2018).** Isolation, screening and identification of biosurfactant producing fungal strains [en ligne]. *International Journal of Advanced Research*. 6(4): 1036-1041. [Consulté le 04/10/2021]. Disponible sur le web : <https://www.journalijar.com/article/23384/isolation,-screening-and-identification-of-biosurfactant-producing-fungal-strains/>

**ROCH P., GIANGRANDE A. et al. (1990).** Comparison of hemolytic activity in eight species of polychaetes [en ligne]. *Marine Biology*. 107 :199–203. [Consulté le 18/09/2021]. Disponible sur le web : <https://link.springer.com/article/10.1007/BF01319818>

**RON E.Z., ROSENBERG E. (2002).** Biosurfactants and oil remediation [en ligne]. *Current Opinion in Biotechnology*. 3: 249-252. [Consulté le 17/08/2021]. Disponible sur le web : <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12180101/>

**-S-**

**SALLENAVE C. (1999).** Etude de la flore fongique des zones conchylicoles de l'estuaire de la Loire. Recherche des souches toxigènes [en ligne]. Thèse de Doctorat. Sciences de la Vie et de la Santé. IFREMER. Université de NANTES. [Consulté le 17/06/2021]. Disponible sur le web : <https://archimer.ifremer.fr/doc/00440/55205/56673.pdf>

**SAMSON R.A., HOEKSTRA E.S. et al. (2004).** Introduction to food and airborne fungi. 7<sup>th</sup> edition [en ligne]. *Utrecht: Centraalbureau voor Schimmel cultures*. [Consulté le 17/06/2021]. Disponible sur le web : <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20053187047>

**SAMSON R.A., VISAGIE C.M. et al. (2014).** Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. *Stud Mycol*, 78: 141-173

**SARKHOH N.A., GHANNOUM M.A. et al. (1990).** Crude oil and hydrocarbon degrading strains of *Rhodococcus*: *Rhodococcus* strains isolated from soil and marine environments in Kuwait. *Environ. Pollut.* 65 : 1–18.

**SEKHON RANDHAWA et al., (2014).** Rhamnolipid biosurfactants- Past, present, and future scenario of global market [en ligne]. Article *Front. Microbial*, 5 :454. [Consulté le 17/10/2021]. Disponible sur le web : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4151382/>

**SILVA D.P ., CAVALCANTI D.D . et al. (2015).** Bio-removal of diesel oil through a microbial consortium isolated from a polluted environment [en ligne]. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 97:85–89. [Consulté le 06/06/2021]. Disponible sur le web : <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201700112881>

**SRIDHAR K.R., PRASANNARAI K. (2001).** Biogeography and biodiversity of higher marine fungi in tropics - A review [en ligne]. *Ecol. Env. & Cons*, 7 (3): 219-234. [Consulté le 21/08/2021]. Disponible sur le web : [https://www.researchgate.net/publication/267452482\\_Biogeography\\_and\\_biodiversity\\_of\\_higher\\_marine\\_fungi\\_in\\_tropics\\_-\\_A\\_review](https://www.researchgate.net/publication/267452482_Biogeography_and_biodiversity_of_higher_marine_fungi_in_tropics_-_A_review)

**STANLEY S.J. (1992).** Observation on the seasonal occurrence of marine endophytic and parasitic fungi [en ligne]. *Can. J. Bot*, 70:2089-2096. [Consulté le 10/09/2021]. Disponible sur le web : <https://cdnsiencepub.com/doi/abs/10.1139/b92-259>

**SUNDE M., PHAM C.L.L. et al. (2017).** Molecular characteristics and biological functions of surface-active and surfactant proteins. *Annu Rev Biochem*. 86:585–608

**SYAKTI A.D. (2004).** Biotransformation des hydrocarbures pétroliers et effets sur les acides gras phospholipides de bactéries hydrocarbonoclastes marines [en ligne]. Thèse de doctorat, Chimie analytique. Marseille. Université de Droit, d'Économie et des Sciences (Aix Marseille III). [Consulté le 17/09/2021]. Disponible sur le web : <https://www.theses.fr/2004AIX30017>

**-T-**

**TAYLOR J.W ., SPATAFORA J. et al. (2004).** The Relationships of Fungi [en ligne]. *The Assembling the Tree of Life* (Joel Cracraft, Michael J. Donoghue eds). Oxford University Press. P 171-194. [Consulté le 06/08/2021]. Disponible sur le web : [https://zmmu.msu.ru/files/%D0%91%D0%B8%D0%B1%D0%BB%D0%B8%D0%BE%D1%82%D0%B5%D0%BA%D0%B0%20%D0%9F%D0%B0%D0%B2%D0%BB%D0%B8%D0%BD%D0%BE%D0%B2%D0%B0/cracraft-donoghue-2003\\_assembling\\_tree\\_life.pdf](https://zmmu.msu.ru/files/%D0%91%D0%B8%D0%B1%D0%BB%D0%B8%D0%BE%D1%82%D0%B5%D0%BA%D0%B0%20%D0%9F%D0%B0%D0%B2%D0%BB%D0%B8%D0%BD%D0%BE%D0%B2%D0%B0/cracraft-donoghue-2003_assembling_tree_life.pdf)

**-V-**

**VILLEMANN D., GUIRAUD P. et al. (2006).** Biotransformation of anthracene and fluoranthene by *Absidia fusca* Linnemann [en ligne]. *Electronic Journal of Biotechnology*. 9(2). [Consulté le 20/06/2021]. Disponible sur le web : [https://www.researchgate.net/publication/27793745\\_Biotransformation\\_of\\_anthracene\\_and\\_fluoranthene\\_by\\_Absidia\\_fusca\\_Linnemann](https://www.researchgate.net/publication/27793745_Biotransformation_of_anthracene_and_fluoranthene_by_Absidia_fusca_Linnemann)

**VISAGIE C.M., VARGA J. et al. (2014).** Ochratoxin production and taxonomy of the yellow aspergilli (*Aspergillus* section *Circumdati*) [en ligne]. *Stud Mycol.* 78: 1-61. [Consulté le 17/04/2021]. Disponible sur le web : [https://backend.orbit.dtu.dk/ws/portalfiles/portal/101181367/Ochratoxin\\_production\\_and\\_taxonomy\\_of\\_the\\_yellow\\_aspergilli\\_Aspgillus\\_section\\_Circumdati.pdf](https://backend.orbit.dtu.dk/ws/portalfiles/portal/101181367/Ochratoxin_production_and_taxonomy_of_the_yellow_aspergilli_Aspgillus_section_Circumdati.pdf)

**VISHWAKIRAN Y., THAKUR N.L. et al. (2001).** Spatial and temporal distribution of fungi and wood-borers in the coastal tropical waters of Goa, India [en ligne]. *Bot. Mar.* 44:47-56. [Consulté le 18/05/2021]. Disponible sur le web : <https://doi.org/10.1515/BOT.2001.007>

**-W-**

**WEST C.C., HARWELL J.H. (1992).** Surfactants and subsurface remediation [en ligne]. *Environ.Sci. Technol.* 36 (12): 2324-2330. [Consulté le 11/10/2021]. Disponible sur le web : <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/es00036a002>

**-Y-**

**YAMADA-ONODERA K., MUKUMOTO H. et al. (2002).** Degradation of long-chain alkanes by a polyethylene-degrading fungus, *Penicillium simplicissimum* YK [en ligne]. *Enzyme and Microbial Technology.* 30: 828-831. [Consulté le 24/07/2021]. Disponible sur le

web : [https://www.researchgate.net/publication/247237812\\_Degradation\\_of\\_long-chain\\_alkanes\\_by\\_a\\_polyethylene-degrading\\_fungus\\_Penicillium\\_simplicissimum\\_YK](https://www.researchgate.net/publication/247237812_Degradation_of_long-chain_alkanes_by_a_polyethylene-degrading_fungus_Penicillium_simplicissimum_YK)

**YOUSSEF N.H., DUNCAN K.E. et al. (2004).** Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganisms [en ligne]. *J Microbiol Methods*. 56:339-347. [Consulté le 28/08/2021]. Disponible sur le web : <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0167701203003105>

**-Z-**

**ZHAO H., CAI C. et al. (2018).** Secondary metabolites of Antarctic fungi antagonistic to aquatic pathogenic bacteria [en ligne]. *Open Life Sciences*. [Consulté le 02/05/2021]. Disponible sur le web : <https://doi/10.1515/biol-2018-0002/html>

**Webographie :**

[www.univ-brest.fr](http://www.univ-brest.fr)

# *Annexes*

## Annexes A

Tableau : Les milieux de culture utilisés

Milieux de culture	Composition
<b>Gélose à l'extrait de Malt (MEA)</b>	Extrait de malt : 20g Peptone : 1g Glucose : 20g Agar : 22g Eau de mer filtrée : 1000 ml pH 5, stérilisation par autoclave à 121°C pendant 20 minutes. 15 gouttes d'antibiotique (Amoxiciline 1g) et 2 gouttes de tween 80.
<b>Milieu PDA</b>	On dilue 49 g de PDA poudre dans 1000ml l'eau de mer filtré .Puis on réalise une stérilisation par autoclave à 121°C pendant 20 minutes. Ensuite on ajoute 15 gouttes d'antibiotique (Amoxiciline 1g) et 2 gouttes de tween 80.
<b>Milieu Czapek concentré (sels minéraux)</b>	Na NO <sub>3</sub> : 30 g KCl : 5 g MgSO <sub>4</sub> ,7H <sub>2</sub> O :5g FeSO <sub>4</sub> ,7H <sub>2</sub> O : 0.1g Zn SO <sub>4</sub> :0.1g CuSO <sub>4</sub> :0.05g Eau de mer filtrée: 1000 ml Une stérilisation est réalisée par autoclave à 121°C pendant 20 minutes. Puis 15 gouttes d'antibiotique (Amoxiciline 1g) et 2 gouttes de tween 80 sont ajoutées.
<b>Milieu Czapek</b>	CZ concentré : 10 ml K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> :1g Saccharose : 30 g Agar : 15g Eau de mer filtrée: 1000 ml Une stérilisation est réalisée par autoclave à 121°C pendant 20 minutes. Puis 15 gouttes d'antibiotique (Amoxiciline 1g) et 2 gouttes de tween 80 sont ajoutées.
<b>Milieu Czapek 1% d'huile d'olive</b>	CZ concentré : 10 ml K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> :1g Agar : 15g Eau de mer filtrée: 1000 ml Une stérilisation est réalisée par autoclave à 121°C pendant 20 minutes. Puis 1 ml d'huile d'olive est ajouté avec 15 gouttes d'antibiotique (Amoxiciline 1g).
<b>Milieu Czapek 1% de pétrole</b>	CZ concentré : 10 ml K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> :1g Agar : 15g Eau de mer filtrée: 1000 ml Une stérilisation est réalisée par autoclave à 121°C pendant 20 minutes. Puis 1 ml de pétrole filtré est ajouté

	avec 15 gouttes d'antibiotique (Amoxiciline 1g) .
<b>Milieu CYA</b>	<p>K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> :1g            CZ concentré : 10 ml            Extrait de levure : 5 g            Sucrose : 30g            Agar : 15 g            Eau de mer stérile : 990 ml            Une stérilisation est réalisée par autoclave à 121°C pendant 20 minutes. Puis 15 gouttes d'antibiotique (Amoxiciline 1g) et 2 gouttes de tween 80 sont ajoutées.</p>
<b>Milieu GN25</b>	<p>Glycérol 250g: 198 ml            Agar: 15g            Extrait de levure : 3.7g            Sels minéraux du CZ : 750ml            Une stérilisation est réalisée par autoclave à 121°C pendant 20 minutes. Puis 15 gouttes d'antibiotique (Amoxiciline 1g) et 2 gouttes de tween 80 sont ajoutées.</p>
<b>CYAs</b>	<p>Saccharose: 30g            Extrait de Malt : 5g            K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> :1g            Na Cl : 50g            CZ concentré : 10 ml            Élément trace : 1ml            Agar : 20g            Eau de mer stérile : 1000 ml            Une stérilisation est réalisée par autoclave à 120°C pendant 15 minutes. Puis 15 gouttes d'antibiotique (Amoxiciline 1g) et 2 gouttes de tween 80 sont ajoutées.</p>

*Annexes B*

**Tableau : produits chimiques utilisés**

<b>Les produits chimiques utilisés</b>	<p>Phénol à 5%,            l'acide sulfurique concentré (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>),            l'hydroxyde de sodium ( NaOH ),            sulfate de cuivre (CuSO<sub>4</sub>)            l'acide nitrique (HNO<sub>3</sub>),            le molybdate d'ammonium à 5% [ (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> ],            chloroforme ( CHCl<sub>3</sub>),            méthanol (CH<sub>3</sub>OH) ,            chlorure de sodium (NaCl).</p>
--	--

*Annexes C***Tableau : Milieux de fermentation utilisés**

<b>Milieux de fermentation</b>	<b>Composition</b>
<b>CYA Liquide</b>	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> :1g CZ concentré : 10 ml Extrait de levure : 5 g Sucrose : 30g Eau de mer filtrée : 990 ml Une stérilisation est réalisée par autoclave à 121°C pendant 20 minutes.
<b>GPY Liquide</b>	Glucose : 20g Tryptone : 3g Extrait de levure : 7g K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> :1g MgSO <sub>4</sub> :0.5g Nacl :5g CaCo <sub>3</sub> :2g Eau de mer filtré : 1000 ml Une stérilisation est réalisée par autoclave à 121°C pendant 20 minutes.

## Résumé :

La contamination des écosystèmes marins par les hydrocarbures représente l'un des problèmes les plus critiques dans l'environnement. Leur élimination de l'environnement marin nécessite l'intervention de plusieurs facteurs. Dans ce contexte, les micro-organismes, en particulier les champignons, jouent un rôle principal et crucial dans le processus de biodégradation. L'objectif de notre travail est d'identifier les espèces de micromycètes filamenteux potentiellement actifs répertoriés au niveau du port d'Alger (à partir du sédiment profond, de l'eau de mer, de débris et d'organismes marins (moules, oursins)) en Algérie. Vingt huit (28) isolats ont été caractérisés et testés pour leur capacité à utiliser et à dégrader les différentes sources de carbone (sucrose, pétrole brut et l'huile d'olive à 1%), ce test a mis en évidence la capacité de la souche *Penicillium sp(4)* à dégrader les différentes sources utilisées.

Tous les isolats fongiques ont répondu positivement aux tests chimiques effectués (test de phénol, test de phosphate, test de biuret) et cela a révélé la nature des biosurfactants produits : glycolipide, lipopeptide et phospholipide.

L'activité biosurfactante des micromycètes qui a été déterminé grâce aux tests effectués (test de déplacement de pétrole, test de drope collapse, test de parafilm et test d'émulsification) a montré des résultats satisfaisants pour l'ensemble des isolats, avec un pouvoir émulsifiant maximum de 57% pour les souches *Aspergillus pseudoglaucus3*, *Aspergillus terreus 11*.

Le test de toxicité a montré que la souche *Penicillium sp 13* a une activité hémolytique importante avec une valeur de 0,156 mg/ml.

Les résultats générés de cette étude démontrent que les isolats fongiques filamenteux testés sont potentiellement actifs et cela peut être une alternative très prometteuse dans le processus de biodégradation des hydrocarbures dans les milieux marins.

**Mots clés :** Micromycètes filamenteux ; hydrocarbure ; biodégradation ; activité biosurfactante ; activité hémolytique.

**Abstract :**

Contamination of marine ecosystems by oil represents one of the most critical problems in the environment. Their elimination from marine environment requires the intervention of several factors. In this context, microorganisms, in particular fungi, play a main and crucial role in the process of biodegradation. The objective of our work is to identify the potentially active filamentous micromycetes species listed at the port of Algiers (from deep sediment, sea water, debris and marine organisms (mussels, sea urchins)) in Algeria. Twenty eight (28) isolates were characterized and tested for their ability to use and degrade different carbon sources (sucrose, crude oil and olive oil at 1%), this test demonstrated the ability to *Penicillium sp (4)* strain degraded the different sources used.

All the fungal isolates responded positively to the chemical tests carried out (phenol test, phosphate test, biuret test) and this revealed the nature of the biosurfactants produced: glycolipid, lipopeptide and phospholipid.

The biosurfactant activity of the micromycetes, which was determined through the tests performed (oil displacement test, drope collapse test, parafilm test and emulsification test) showed satisfactory results for all the isolates, with a maximum emulsifying power of 57% for the strains *Aspergillus pseudoglaucus*3, *Aspergillus terreus* 11.

The toxicity test showed that the strain *Penicillium sp 13* has significant hemolytic activity with a value of 0.156 mg / ml.

The results generated from this study demonstrate that the filamentous fungal isolates tested are potentially active and this may be a very promising alternative in the process of biodegradation of hydrocarbons in marine environments.

**Keywords:** Filamentous micromycetes ; hydrocarbon ; biodegradation ; biosurfactant activity ; hemolytic activity.

## الملخص:

يعد تلوث النظم البيئية البحرية بالنفط من أكثر المشاكل خطورة في البيئة. يتطلب إزالتها من البيئة البحرية تدخل عدة عوامل. في هذا السياق ، تلعب الكائنات الحية الدقيقة ، ولا سيما الفطريات ، دوراً رئيسياً وحاسماً في عملية التحلل البيولوجي. الهدف من عملنا هو التعرف على أنواع الميكروسيئات الخيطية النشطة والمدرجة في ميناء الجزائر العاصمة (من الرواسب العميقة ومياه البحر والحطام والكائنات البحرية (بلح البحر وقنافذ البحر)) في الجزائر. تم توصيف واختبار ثمانية وعشرين (28) عزلة من حيث قدرتها على استخدام مصادر الكربون المختلفة وتحطيمها (سكروز ، 1% من النفط خام و زيت زيتون) أظهر هذا الاختبار قدرة سلالة (*Penicillium sp 4*) على تحطيم المصادر المختلفة المستخدمة.

استجابت جميع العزلات الفطرية بشكل إيجابي للاختبارات الكيميائية التي أجريت (اختبار الفينول ، اختبار الفوسفات ، اختبار بيوريت) وهذا كشف عن طبيعة المواد الخافضة للتوتر السطحي المنتجة : الجليكوليبيد ، البيبتيد الدهني والفوسفوليبيد.

أظهر نشاط الفاعل الحيوي للميكروسيئات الذي تم تحديده بفضل الاختبارات التي أجريت (اختبار إزاحة الزيت ، اختبار إسقاط الانهيار، اختبار البارافيلم واختبار الاستحلاب نتائج مرضية لجميع العزلات مع قدرة استحلاب قصوى قدرها 57% لسلالات (*Aspergillus pseudoglaucus* و *Aspergillus terreus 11*)

أظهر اختبار السمية أن سلالة *Penicillium sp 13* لها نشاط انحلاي معنوي بقيمة 0.156 ملغ / مل.

تظهر النتائج التي تم الحصول عليها من هذه الدراسة أن العزلات الفطرية الخيطية المختبرة نشطة بشكل محتمل وقد يكون هذا بديلاً واعدًا للغاية في عملية التحلل البيولوجي للهيدروكربونات في البيئات البحرية.

**الكلمات المفتاحية :** الفطريات الدقيقة الخيطية ؛ الهيدروكربون ؛ تحلل حيوي ؛ النشاط الحيوي ؛ النشاط الانحلاي.