



République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère De l'Enseignement Supérieur et De la Recherche Scientifique



**UNIVERSITE ABBES LAGHROUR – KHENCHELA**  
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE  
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE MOLECULAIRE ET CELLULAIRE  
MEMOIRE

Présenté pour l'obtention du diplôme de

**MASTER ACADEMIQUE**

Filière: **Biologie**

Option: **Microbiologie appliquée**

Thème:

**RECHERCHE DES ACTIVITES  
HYDROLYTIQUES ET ANTAGONISTES DE  
LEVURES ISOLEES A PARTIR DE SOL  
FORESTIER DE LA REGION DE KHENCHELA**

Présenté par :

**SAOUDI Hana**

**IDIR Sohila**

Jury de soutenance:

Presidente:	Dr. DEROUCHE.F	(MCB)	Univ. Abbès Laghrou – Khenchela
Encadrante:	Dr. MERABTI. R.	(MCA)	Univ. Abbès Laghrou – Khenchela
Examinatrice:	ARAB. Y	(MAA)	Univ. Abbès Laghrou -Khenchela

**2020/2021**



République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère De l'Enseignement Supérieur et De la Recherche Scientifique



**UNIVERSITE ABBES LAGHROUR – KHENCHELA**  
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DELAVIE  
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE MOLECULAIRE ET CELLULAIRE  
MEMOIRE

Présenté pour l'obtention du diplôme de

**MASTER ACADEMIQUE**

Filière: **Biologie**

Option: **Microbiologie appliquée**

Thème:

**RECHERCHE DES ACTIVITES  
HYDROLYTIQUES ET ANTAGONISTES DE  
LEVURES ISOLEES A PARTIR DE SOL  
FORESTIER DE LA REGION DE KHENCHELA**

Présenté par

**SAOUDI Hana**

**IDIR Sohila**

Jury de soutenance:

Presidente : Dr. DEROUICHE.F (MCB) Univ.Abbès Laghrou–Khenchela  
Encadrante : Dr. MERABTI. R. (MCA) Univ.AbbèsLaghrou–Khenchela  
Examinatrice: ARAB. Y (MAA) Univ.AbbèsLaghrou-Khenchela

**2020-2021**

## ***Remerciement***

*Avant tout nous remercions "Allah" le tout puissant, le Miséricordieux, qui nous a donné le courage, la volonté, la force, la santé et la persistance pour accomplir ce modeste travail. Merci de nous avoir éclairé le chemin de la réussite.*

*A Mme **Merabti Ryma**, nous adressons nos remerciements les plus sincères pour encadrement et ses orientations, ses aides, sa patience sa compétence et sa gentillesse.*

*A Mme **Derouiche Faouzia** pour avoir bien accepté de présider ce jury afin d'examiner ce mémoire et nous éclairer par ces précieux conseils.*

*A Mme **ArabYassmine** d'avoir bien accepté d'examiner ce mémoire et nous éclairer par ces précieux conseils.*

*Nos remerciements aussi tous les enseignants et enseignantes qui nous ont fait former durant ces 5 années, en nous préparant pour cette dernière année de master. Merci pour vos encouragements et votre gentillesse.*

*Nous associons mes remerciements à toutes nos amies pour leur solidarité, leur aide, et leur disponibilité.*

## *Dédicaces*

*Je dédie ce travail a:*

*A l'homme de ma vie, mon exemple éternel, mon soutien moral et source de joie et de bonheur, celui qui s'est toujours sacrifié pour me voir réussir mon père «**Mohammed** » j'espère que tu seras fier de moi, que dieu te garde dans son vaste paradis*

*A la lumière de mes jours, la source de mes efforts, la flamme de mon cœur, ma vie et mon bonheur; maman « **Oum hani** » que dieu te garde dans son vaste paradis.*

*A mes adorables sœurs : « **Feriel** » « **Chahed** » « **Manar** » et «**Hadjer** ».*

*A mes grande mères : « **lbida** » et «**Hania** »*

*A mes chères tantes : «**Zahira** » et « **Malika** » pour leur encouragement et soutien moral.*

*A mon binôme «**Sohila** » et mes amies «**Aziza** » «**Manel**» « **Amira** »et «**Asma**».*

**HANA**

## ***Je Dédie ce modeste travail***

*À ma chère mère **ABBES TOUNES** et mon cher père **LAKHDER**, pour leur endurance et Leurs sacrifices sans limites.*

*À mes frères: **ALAID, CHAHER** et mes soeurs ; **HANANE** et **RITADJ**, en reconnaissance de leur affection toujours constante. et mon grand-pères  
**MOHAMMED TAHER ABBES***

*À mes chères amies « **Samah** », « **Bessma** », « **Randa** », « **Raja** »,  
« **wissem** » et « **lamia** » « **Asma** » et « **Wassila** »*

*À toutes mes chères amies, mon binôme **HANA** et tous  
ceux qui ont joué un rôle dans ce travail*

**souhila**

## Table des matières

<b>Liste des abréviations.....</b>	<b>I</b>
<b>Liste des figures.....</b>	<b>II</b>
<b>Liste des tableaux.....</b>	<b>III</b>
<b>Résumé</b>	
<b>Abstract</b>	
<b>المخلص</b>	
<b>INTRODUCTION GENERALE.....</b>	<b>01</b>
<b>REVUE BIBLIOGRAPHIQUE</b>	
<b>I : Levures</b>	
1. Généralités.....	03
2 .Habitat .....	05
3. Classification.....	05
4. Besoins nutritifs .....	06
4. 1 Sources de carbone .....	06
4.2 Sources d'azote .....	07
4.3Eléments et facteurs de croissance .....	07
5. Les conditions physicochimiques de croissance.....	08
5.1 La température.....	08
5.2 Le pH .....	08
5.3 L'aération .....	09
5.4 La pression osmotique et l'activité d'eau .....	09
6 .Techniques d'identification .....	09
6.1 Etude des caractères cultureux.....	09
6 .2 Etude des caractères morphologiques et cellulaires .....	09
6.3 Caractéristiques biochimiques et physiologiques .....	10
7. Applications et utilisations des levures.....	10
8. Antagonisme.....	11
8.1 .L'antagonisme microbien .....	13
8.2. Antagonisme en écologie.....	13
8.3. Phénomène killer des levures .....	13
<b>II : Le sol</b>	
1. Définition.....	18
2 .Constituants du sol .....	18

2.1. La phase gazeuse.....	19
2.2 .La phase liquide.....	19
2.3. La phase solide.....	19
2.3.1. Fraction minérale.....	20
2.3.2. La fraction organique .....	20
4. Microflore du sol .....	22
4.1. Bactéries .....	22
4.2. Les champignons.....	22
4.3. Algues et protozoaires.....	22
<b>MATERIEL ET METHODES</b>	
1. Echantillonnage .....	24
2. Isolement des levures.....	24
3. Caractérisation partielle et sélection des isolats .....	27
3.1. Etude des caractères culturaux des levures.....	27
3.1 .1 Identification macroscopique.....	27
3.1.2. Purification .....	27
4. Mise en évidence des activités hydrolytiques.....	27
• Activités amylolytiques.....	27
• Activités protéolytiques.....	28
• Recherche des activités Antagonistes .....	28
<b>RESULTATS ET DISCUSSION</b>	
1. Isolement et identification partielle des levures .....	29
1.1 Caractéristiques macroscopiques.....	29
1.2 Caractéristiques microscopiques.....	29
2. Détermination des activités hydrolytiques.....	31
a) Activité amylolytique.....	31
b)Activité protéolytique.....	32
3. Pouvoir d'antagonisme des levures.....	33
<b>CONCLUSION ET PERSPECITIVES.....</b>	<b>34</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>35</b>
<b>ANNEXES</b>	

# LISTE DES ABREVIATIONS

**C°** : degré Celsius

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

**HCO<sub>3</sub>** : bicarbonate

**K**: potassium

**L**: levure

**Mg**: magnésium

**MYPG**: milieu yeast peptone glucose

**Na**: sodium

**NO<sub>3</sub>**: nitrate

**PDA** : potato dextrose agar.

**PH**: Potentiel Hydrogène

<b>N°</b>	<b>Liste des figures</b>	<b>Page</b>
<b>01</b>	Présentation d'une cellule de levure	<b>04</b>
<b>02</b>	Division de cellules levurienne par bourgeonnement	<b>04</b>
<b>03</b>	Cycle de reproduction des levures	<b>05</b>
<b>04</b>	Filamentisation des levures	<b>10</b>
<b>05</b>	Mise en évidence sur milieu gélosé du phénotype killer contre deux isolats de <i>Candida albicans</i>	<b>14</b>
<b>06</b>	Les trois phases du sol.	<b>21</b>
<b>07</b>	Répartitions de la constitution des sols	<b>21</b>
<b>08</b>	Site de prélèvement du sol	<b>24</b>
<b>09</b>	Les étapes du protocole de l'isolement	<b>26</b>
<b>10</b>	Contaminants de genre <i>Penicillium</i>	<b>28</b>
<b>11</b>	Observation macroscopique des colonies	<b>29</b>
<b>12</b>	Observation microscopique des levures (Grossissement x100)	<b>30</b>
<b>13</b>	Résultats de l'activité amylolytiques L1, L2, L5, L6.	<b>32</b>
<b>14</b>	Résultat de l'activité protéolytique de la souche L1 et L2	<b>32</b>

<b>N°</b>	<b>Liste des tableaux</b>	<b>Page</b>
<b>01</b>	Classification des levures	<b>06</b>
<b>02</b>	Importance de certains oligoéléments et vitamines pour la croissance des levures	<b>07</b>
<b>03</b>	Production et utilisation de certains enzymes de levures	<b>12</b>
<b>04</b>	Espèces de levures pour lesquelles l'activité killer a été rapportée	<b>15</b>
<b>05</b>	Distribution des microorganismes en fonction du sol	<b>23</b>
<b>06</b>	Caractéristiques macro et microscopiques des isolats sélectionnés	<b>30</b>
<b>07</b>	Résultats des activités hydrolytiques et l'antagonisme	<b>34</b>

Les levures sont des champignons unicellulaires qui possèdent un grand intérêt dans plusieurs domaines notamment alimentaires, industriels et biotechnologiques.

L'objectif du présent travail est la recherche et l'isolement de souches levuriennes à partir de sol forestier local. Cette recherche a permis d'isoler six souches de levures, qui ont été par la suite évaluées pour leurs activités antagonistes contre des contaminants du genre *Penicillium*, ainsi que leurs aptitudes amylolytiques et protéolytiques.

La recherche de l'activité antagoniste sur milieu MYPG a permis de conclure que les levures testées n'ont pas d'effet sur la croissance des contaminants. Par ailleurs, la recherche de l'activité amylolytique sur milieu PDA additionné d'amidon soluble à 1%, a mis en évidence la production d'amylases extracellulaires chez 4 isolats sur les 6 étudiés. D'autre part, l'activité protéolytique sur milieu gélose au lait écrémé a été développée chez une souche seulement (L1).

**Mot clés :** sol, levures, antagonisme, protéases, amylases.

Yeasts are unicellular fungi that are of great interest in several fields, including food, industry and biotechnology. The objective of the present work is the research and isolation of yeast strains from local forest soil. This research allowed the isolation of six yeast strains, which were then evaluated for their antagonistic activities against contaminants of the genus *Penicillium*, as well as their amylolytic and proteolytic abilities.

The research of antagonistic activity on MYPG medium led to the conclusion that the yeasts tested had no effect on the growth of contaminants. In addition, the amylolytic activity test on PDA medium with 1% soluble starch added revealed the production of extracellular amylases in 4 of the 6 isolates studied. On the other hand, proteolytic activity on skim milk agar medium was developed in one strain only (L1).

**Key words:** soil, yeast, antagonism, proteases, amylases.

الخميرة هي فطريات وحيدة الخلية لها أهمية كبيرة في العديد من المجالات ، لا سيما الأغذية والصناعة والتكنولوجيا الحيوية

الهدف من هذا العمل هو البحث وعزل سلالات الخميرة من تربة الغابات المحلية سمح هذا البحث بعزل ستة سلالات من الخميرة ، والتي تم تقييمها لاحقاً لأنشطتها العدائية ضد ملوثات جنس البنسليوم ، بالإضافة إلى قدراتها على التحلل النشائي والتحلل للبروتين

أدى البحث عن نشاط المضاد على وسيط MYPG إلى استنتاج مفاده أن الخمائر المختبرة لم يكن لها أي تأثير على نمو الملوثات. بالإضافة إلى ذلك ، فإن البحث عن نشاط اميلاز على وسط PDA المضاف إليه النشا القابل للذوبان بنسبة 1 % ، أظهر إنتاج الأميلاز في 4 عزلات من أصل 6 تمت دراستها. من ناحية أخرى ، تم تطوير نشاط التحلل البروتيني على وسط أجار الحليب الخالي من الدسم فقط في سلالة واحدة (س 1)

**الكلمات المفتاحية:** تربة ، خمائر ، تنافس ، بروتياز ، أميلاز

*Introduction*

*Générale*

Les levures sont des champignons unicellulaires, non photosynthétiques, microscopiques se développant par divisions cellulaires, chimio-hétérotrophes (puisent leur énergie dans la dégradation de substances organiques variées) , ont la capacité de se multiplier rapidement et elles sont moins exigeantes en nutriments. Les levures sont facilement mises en œuvre dans d'autres exploitations (culture, recherche et applications industrielles) par rapport aux procaryotes et possèdent un capital génétique qui subit peu de mutations. A l'heure actuelle les levures constituent un matériel expérimental de choix en raison de leur double état de micro-organismes et d'eucaryotes (**Pol., 1996**).

Leur utilisation remonte à l'antiquité, notamment pour la production de boissons alcoolisées via la fermentation par les Babyloniens en 1600 ans av. J.C. Les levures sont les premiers microorganismes observés au microscope puis dessinés par Antony Van Leeuwenhoek en 1680. Suite à ces travaux, Louis Pasteur contribua à la fondation de la microbiologie (**Pol., 1999**).

L'antagonisme est l'inhibition d'un micro-organisme par un autre. Il en résulte souvent une situation dans laquelle la colonisation d'une certaine zone par un nouvel organisme est impossible s'il a une relation antagoniste avec des organismes déjà présents. L'antagonisme peut être entraîné par des mécanismes tels que la production d'antibiotiques ou la compétition et il aide souvent les humains à échapper aux infections intestinales, car de nombreuses bactéries qui peuplent nos intestins sont antagonistes aux agents pathogènes .

Les levures semblent être des agents de biocontrôle très prometteurs, car elles se développent et colonisent rapidement la surface des fruits (**Mari et Guizzardi ., 1998**). La lutte biologique contre les pourritures des fruits en utilisant des microorganismes antagonistes s'est déjà révélée comme une alternative aux fongicides de synthèse. En effet, des résultats très encourageants ont été rapportés sur plusieurs types de fruits tels que les agrumes (**Chalutz et Wilson., 1990 ; El-Ghaouth et al., 2000**).

Les hydrolases représentent 80% dans Le marché mondial des enzymes, particulièrement les amylases et les protéases (**Morvan .,2010**). Les  $\alpha$ -amylases sont parmi les plus importantes enzymes à l'échelle industrielle, ce qui les rendent l'un des outils-clés des biotechnologies (**Little., 2004**).

Certaines levures produisent aussi des enzymes protéolytiques, il s'agit essentiellement des genres *Saccharomyces*, *Rhodotorula*, *Candida*, *Debaryomyces*. *Saccharomyces cerevisiae* par exemple, produit trois types de protéases ; une aspartylprotéase, une sérine protéase et une métalloprotéase. L'activité protéolytique de ces genres est utilisée particulièrement pour l'affinage des fromages (**Kresze, 1991 ; Boiron, 1996**).

Dans le présent travail, nous avons choisi de s'intéresser à certaines caractéristiques technologiques, notamment hydrolytiques et antagonistes, des levures autochtones isolées à partir de sol forestier dans la région de Khenchela. L'objectif de notre travail est :

- d'isoler et de caractériser partiellement les levures.
- d'évaluer et de mettre en évidence les activités hydrolytiques (amylolytiques et protéolytiques) des isolats sélectionnés.
- d'évaluer et de mettre en évidence l'activité antifongique des isolats afin de sélectionner les isolats à potentiel antagoniste pour une éventuelle utilisation comme agent de biocontrôle.

*Revue*

*Bibliographique*

## **I. Les levures**

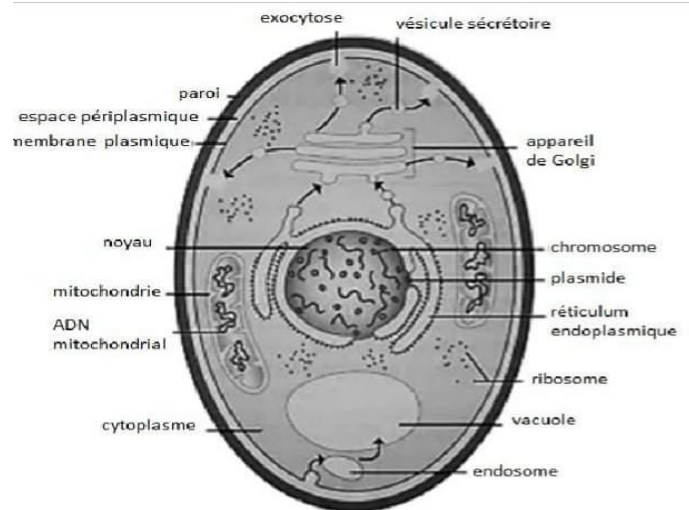
### **1. Généralité**

Selon (**Phaff et al ., 1968**) levure à l'origine provient du mot latin « levare » qui signifie lever. Cette nomenclature est appliquée aux levures en raison de leur capacité à produire du CO<sub>2</sub> pendant la fermentation et à lever la surface mousseuse d'un milieu liquide de fermentation (**Oteng etGyang., 1984**).

Les levures sont des champignons microscopiques qui peuvent survivre dans des conditions aérobies ou anaérobie et dans des milieux composés de sources métabolisables de glucide, d'azote, de vitamines et de minéraux. Les levures préfèrent le développement en milieu acide : leur pH optimale est de 4,5 à 6,5 et d'autres tolèrent des valeurs entre 2,5 et 8,0 (**Barnett et al., 1990**). Les levures sont des organismes mésophiles, elles ne croissent généralement pas à des températures supérieures à 40°C et leur optimum se situe généralement entre 25 et 30°C (**Rose et Harrison., 1987**).

Les cellules des levures ont une forme sphérique ou ovoïde (Figure1), leur taille est plus grande que celles des bactéries (de taille de quelques microns à 30 µ). A certains stades de leur vie, elles peuvent parfois former des filaments et constituer un pseudo-mycélium ou un vrai mycélium (**Barnett et al., 2000**) .

Les levures se reproduisent de façon asexuées (végétatif) ou sexées. La reproduction végétative se fait par bourgeonnement ou fission (**Larpent., 1992**) (Figure2), dans la reproduction sexuée il y'a formation d'un zygote diploïde à partir de deux noyaux haploïde qui ensuit multiple par voie végétatif lorsque les conditions favorable, le zygote subit une méiose ou les quatre noyaux haploïdes forment quatre ascospores donnant plus tard des cellules haploïdes (**Boiron ., 1996**)(Figure3).

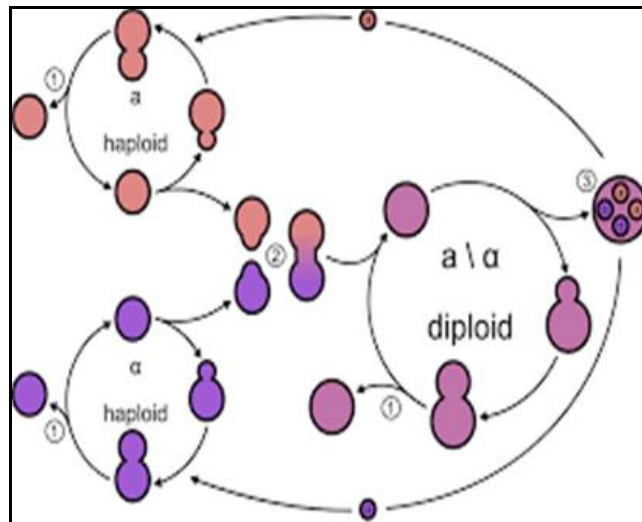


**Figure N° 01** : Présentation d'une cellule de levure (Manyri., 2005).



**Figure N° 02** : Division de cellules levurienne par bourgeonnement.

(Kwon-Chung *et* Bennett., 1992).



**Figure N° 03 :** Cycle de reproduction des levures (Leclerc *et al.*, 1995).

## 2. Habitat

Les levures sont parmi les microorganismes les plus répandues peuvent coloniser différentes régions dans la nature. Se trouvent sur les végétaux riches en sucres directement assimilables (Bouix *et* Leveau., 1991). Les milieux fortement concentrés en sucres représentent un de leurs environnements préférés, (Leclerc., 1995 ; Oteng-Gyang., 1984). On les rencontre à la surface ou à l'intérieur d'autres êtres vivants, dans les eaux et dans l'atmosphère (Leveau *et* Bouix, 1982 ; Pol., 1999). Le sol constitue un large réservoir assurant leur survie dans des conditions défavorables (Leclerc., 1995).

## 3. Classification

Actuellement 60 genres et 500 espèces (tableau 1) sont répertoriés (Lodder., 1971). Selon leur mode de reproduction, les levures se divisent en trois grandes classes :

- **Les ascomycètes (hémi ascomycètes) :** reproduction sexuée dans un asque qui résultent de la transformation d'une cellule après méiose (Meyer *et al.*, 2004) .
- **Les basidiomycètes:** ils sont parfois classés parmi les deutéromycètes. A l'issue d'une reproduction sexuée, se forment des exo-spores ou «basidiospores» portées par une baside (Hencke., 2000).

- **Les deutéromycètes:** présent un mode de reproduction végétatif, la reproduction sexuée est inconnu (Hencke., 2000).

**TableauN° 01:** Classification des levures (Kreger van., 1984)

Classes	Ordres	Familles	Genres
<b>Ascomycètes</b>	<i>Endomycétales</i>	<i>Spermophthoraceae</i>	<i>Coccidiascus</i>
		<i>Saccharomycetaceae</i>	<i>Metschnikowia</i> <i>Nematospora</i> <i>Schizosaccharomyces</i>
<b>Basidiomycètes</b>	<i>Ustilaginales</i>	<i>Filobasidaceae</i>	<i>Chionosphaera</i>
	<i>Tremellales</i>	<i>Levures à télisporos</i>	<i>Filobasidiella</i>
		<i>Sirobasidiaceae</i>	<i>Filobasidium</i>
		<i>Tremellaceae</i>	<i>Leucosporidium</i>
<b>Deutéromycètes</b>	<i>Blastomycetales</i>	<i>Cryptococcaceae</i>	<i>Aciculoconidium</i>
		<i>Sporobolomycetaceae</i>	<i>Brettanomyces</i>
			<i>Candida</i> <i>Cryptococcus</i>

#### 4. Besoins nutritifs

Pour leur développement et leur croissance les levures nécessitent :

##### 4. 1 .Source de carbone

Les sources carbonées fournissent le carbone nécessaire à la biosynthèse des constituants cellulaires (Botton., 1991). Les levures utilisent principalement des sucres comme source de carbone et d'énergie (hétérotrophes). Certaines levures capables d'oxyder des acides organiques et des alcools utilisent des sources de carbone non conventionnelles (éthanol, glycérol) (Oteng-Gyang.,1984). Cependant, leur croissance sur des substrats non-

glucidiques les oblige à synthétiser des sucres exigés pour la biosynthèse macromoléculaire, en particulier celle des polysaccharides complexes (Walker *et al.*, 1997).

#### 4.2. Source d'azote

Les levures utilisent les formes oxydées ou réduites de l'azote pour la synthèse des composés azotés structuraux et fonctionnels de la cellule (Babjeva *et al.*, 1977). La plupart des levures sont capables d'assimiler différentes sources d'azote organique et inorganique pour la biosynthèse d'acides aminés, de protéines, d'acides nucléiques et de vitamines (Larpenet Larpenet-Gourgaud., 1990 ; Guiraud., 1998). Autres levures peuvent utilisés les nitrates et d'autres composés comme source d'azote (Walker *et al.*, 2000).

#### 4.3. Eléments et facteurs de croissance

Sont des substances nécessaires à la croissance optimale des microorganismes ou bien les levures tel que les sels minéraux et d'oligoéléments présents à de très faibles concentrations (Larpenet Sanglier, 1992 ; Boiron, 1996). Les vitamines comme la biotine, la thiamine et l'acide pantothénique sont des facteurs essentiels (tableau 2). Ces facteurs jouent un rôle essentiel dans les réactions enzymatiques en étant des éléments constitutifs de coenzymes variés (Rivière .,1975 ; Botton *et al.*, 1991) .

**TableauN° 02:** Importance de certains oligoéléments et vitamines pour la croissance des levures (Walker ., 2000 et Lourens et Reid., 2002).

<b>Oligoéléments et facteurs de croissance</b>	<b>Rôle</b>
<b>Magnésium</b>	-Stabilité et perméabilité des membranes.  -Protection de la cellule contre les facteurs négatifs (choc thermique et la toxicité de l'éthanol).

<b>Manganèse</b>	-Il appuie la synthèse de la thiamine et des protéines, ce qui contribue à l'augmentation de la biomasse
<b>Zinc</b>	-Coenzymes pour certains enzymes. -Contribution à la synthèse de la riboflavine et certaines protéines
<b>Biotine</b>	-Essentielle dans les réactions de carboxylation et de décarboxylation. -Production des alcools et des esters
<b>Thiamine</b>	-Synthèse de l'isoleucine et de la valine.
<b>Acide pantothénique</b>	-Synthèse de l'Acetyl-COA -Production des acides gras et des acides aminés.

## **5. Les conditions physicochimiques de croissance**

### **5.1. La température**

La croissance adéquate des levures est effectuée à des températures entre 25 et 30°C, autres levures poussent dans les régions à températures constamment basses ou élevées (**Vishniac et Hempfling., 1979**).

### **5.2. Le pH**

Les levures tolèrent des valeurs de pH compris entre 2.4 et 8.6., le pH intracellulaire est compris entre 5.8 et 6.8 (**Bouix et Leveau., 1991**). Cependant, selon (**Phaff et ses**

**collaborateurs 1978)** la majorité des levures connues, ont une bonne croissance à des pH proches de 3.

### **5. 3. L'aération**

La fermentation et la respiration sont des modes de reproduction énergétique utilisés par les levures, ces processus sont réglés par des facteurs environnementaux. (**Walker et al.,1997**). En effet, toutes les levures sont capables de se développer en présence d'oxygène, il n'y a pas de levures anaérobies strictes, certaines sont aérobies strictes et d'autres sont aéro-anaérobies facultatives (**Bouix et Leveau., 1991**).

### **5.4. La pression osmotique et l'activité d'eau**

L'activité de l'eau optimale pour les souches levuriennes est égale à 0,90. Les levures résistent mieux que les bactéries à la pression osmotique : en accumulant des polyols comme osmoprotecteurs (betaine, glycérol).Par conséquent, certaines espèces sont osmophiles mais avec un métabolisme lent. Ces levures sont dites xérotolérantes (**Bourgeois et al., 1996**).

## **6. Techniques d'identification**

Selon (**Guiraud., 1998**), l'identification des levures est basée sur la morphologie, la sexualité et les caractères cultureux.

### **6.1. Etude des caractères cultureux**

Cette étude est effectuée à partir d'ensemencement sur milieux liquides et solides. Le but est d'examiner l'aspect, la forme, la couleur et la consistance des cultures (**Guiraud., 1998**).

### **6.2 .Etude des caractères morphologiques cellulaires**

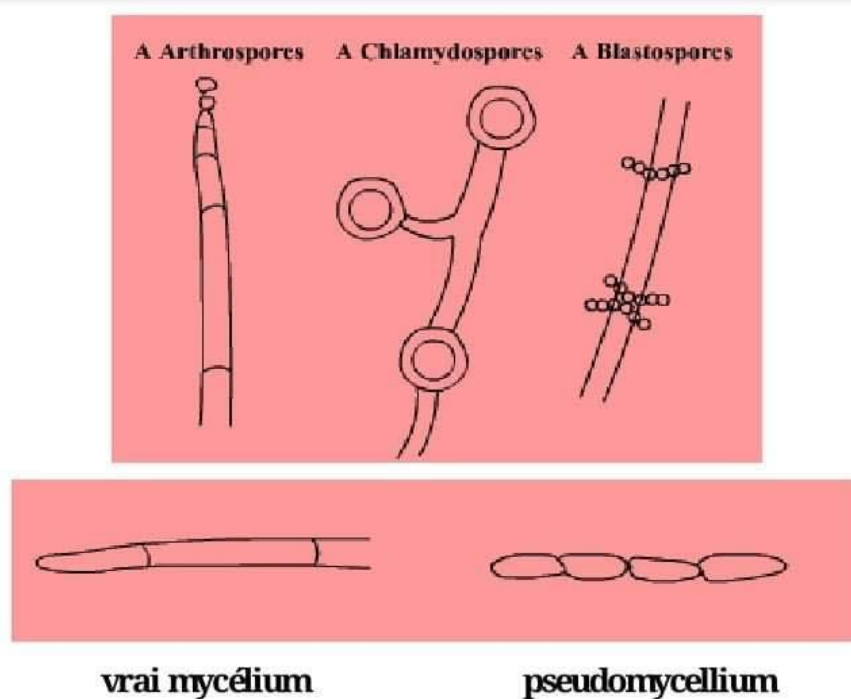
Selon **Wickerham, (1951).**, **Van der Walt, (1970)**, **Van der Walt et Yarrow, (1984)** les principaux critères pour distinguer les levures sont :

- **Morphologie cellulaire normale et mode de reproduction végétative**

Les examens microscopiques, permettant de déterminer la forme, l'arrangement, mode de division des cellules, aussi de mesurer leur taille en utilisant un oculaire micrométrique.

- **Aptitude à la filamentation**

Certaines espèces peuvent former des filaments de type mycélien. Ces filaments sont parfois mis en évidence par l'examen microscopique précédant. La recherche systématique de l'aptitude à la filamentation d'une souche, doit cependant s'effectuer après une culture sur un milieu spécifique (Figure 4).



**Figure N° 04:** Filamentation des levures (Guiraud., 1998)

- **Morphologies particulières**

Dans des milieux pauvres et sous tension d'oxygène réduite, la formation de chlamydo-spores et de ballistospores est observée. Leur recherche s'effectue à partir de milieux spécifiques. (Figure4).

- **Caractéristiques sexuelles**

La reproduction sexuée est l'essentiel base de distinction des genres. La formation d'ascospores est un critère taxonomique très important. Différents milieux de sporulation sont utilisés, pour mettre en évidence les asques, leur forme, la couleur et le nombre de spores par asque.

### **6.3. Caractéristiques biochimiques et physiologiques**

- **Etude des caractères biochimiques et physiologiques**

L'identification des levures est basée essentiellement sur la fermentation et l'assimilation de différents substrats carbonés et azotés (**Kreger-Van-Rij., 1984 ; Lodder 1971**).

- **Fermentation des sucres**

La fermentation des sucres est effectuée sur milieu de culture liquide lors du piégeage du dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>), produit dans la cloche de Durham (**Larpent., 1991**).

- **Utilisation des substrats carbonés**

L'oxydation de différentes sources de carbone nécessite des milieux de culture, contenant des hexoses, des pentoses, des di et tri saccharides, des polysaccharides, des alcools, des acides organiques et des hétérosides (**Bouix et Leveau., 1991**).

- **Utilisation des substrats azotés**

Les levures sont dotées de capacité d'assimilation de l'ammonium, des peptones, des acides aminés l'urée. Par ailleurs, autres levures peuvent utiliser les nitrates, l'éthylamine, la cadaverine, etc comme source d'azote (**Guiraud., 1998**).

## 7. Applications et utilisation des levures

Les levures sont utilisées dans les industries agroalimentaires grâce à de différents produits issus de leur métabolisme (**Larpen, 1990**), elles sont utilisées dans la fabrication traditionnelle des boissons alcoolisées, du vinaigre, de la choucroute, des produits à base de soja (sauce de soja), du pain, des produits laitiers (fromage, kéfir) ...etc. Les levures sont connues dans la valorisation de déchets agricoles et industriels (**Leclerc et al., 1995; Scriban, 1984**).

Les levures ont une grande importance dans le domaine de la biotechnologie, elles aident à l'élaboration de nombreux produits alimentaires (panification, fromagerie, brasserie), la production d'enzymes (invertase, lactase, lipase, amylase), d'alcool (glycérol), de vitamines et de solvants (Tableau 3) (**Scriban, 1984 ; Leclerc et al., 1995**).

**Tableau N° 03** : Production et utilisation de certains enzymes de levures (**Simon et Meunier, 1970 ; Sicard, 1982**)

---

Types d'enzymes	Levures utilisées	Utilisations
<b>Amylases</b>	<i>Lipomyces Starkey</i>	Saccharification de l'amidon, boulangerie, textile, papeterie.
	<i>Schwanniomyces Castellii</i>	
<b>Invertases</b>	<i>Saccharomyces carlbergensie</i>	Confiserie
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
<b>Lipases</b>	<i>Candida lipolytica</i>	Fromagerie, laiterie.
<b>Lactases</b>	<i>Candida pseudotropicalis</i>	Crèmes glacées
	<i>Kluyveromyces fragilis</i>	

---

Selon (Fossi *et al.*, 2005) les levures amylolytiques tirent l'importance des chercheurs en bio industrie à cause de leur capacité à produire différentes enzymes amylolytiques. La composition de milieu de cultures est important pour l'excrétion adéquat des amylases (OtengGyang *et al.*, 1980 et Aiyer, 2005).

## **8. Antagonisme**

### **8.1. L'antagonisme microbien**

L'antagonisme est largement utilisé dans les ouvrages traitant de lutte biologique. Beaucoup plus utilisé pour désigner la situation d'un organisme exerçant un effet inhibiteur sur un autre organisme qu'il tend à éliminer sans le consommer.

L'antagonisme possède une étape bien définie entre l'amensalisme (situation - 0) et la compétition (situation ou, comme nous le verrons, les deux partenaires sont en difficulté) (Davet ., 1996). Il existe nombreux types d'antagonistes dans la nature qui exercent un contrôle biologique plus ou moins efficace sur les pathogène des plantes. L'homme a toujours tenté d'augmenter l'efficacité des antagonistes à travers l'introduction de nouvelle grande population de ces microorganismes au champ où elle n'existe pas, ou à travers la stimulation de leur croissance en apportant des amendements au sol. Dans les deux cas, le résultat est un accroissement des activités inhibitrices des antagonistes contre les pathogènes.

Bien que certains cas de lutte biologique efficace aient été enregistrés, le potentiel d'un contrôle éventuel des maladies avec cette méthode reste actuellement limité car, contrairement au laboratoire et sous serre, les résultats au champ ne sont pas d'habitude d'un succès particulier (Nasraoui ., 2006) .

### **8. 2. Antagonisme en écologie**

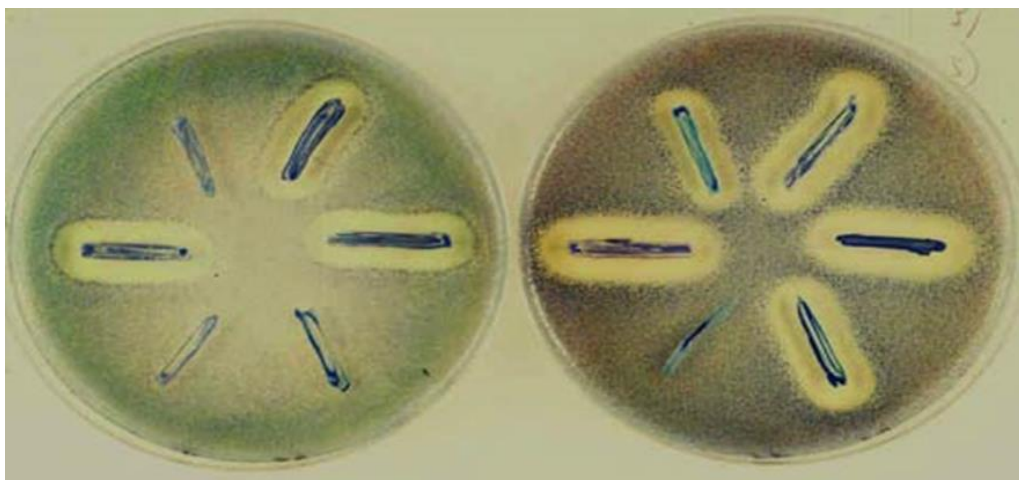
L'antagonisme est défini comme l'inhibition ou une action défavorable entre deux organismes à l'intérieur d'une population microbienne mixte (Curl *et Truelove.*, 1986). En écologie l'antagonisme se manifeste généralement soit par une compétition, un hyper parasitisme, une production de sidérophores ou par une antibiose.

### 8.3. Phénomène killer des levures

Le phénomène killer chez les levures possède une activité équivalente à celle d'antibiotique et des bactériocines, il est mis en évidence la première fois à partir d'une souche de *S. cerevisiae* isolée de contaminants de brasserie (**Bevan et Makover., 1963**).

La protéine ou la glycoprotéine, de faible poids moléculaire, secrétée par la souche dite « killer » est l'élément clé de ce phénomène grâce à l'action létale sur des microorganismes voisins qualifiés de « sensibles », sans contact direct de cellule à cellule (interaction indirecte). Les levures killer possèdent la capacité liée à une immunité spécifique protégeant les levures killer contre leurs propres toxines mais elle est sensible aux toxines produites par autres souches killer (**Mushtaq et al., 2010**). On qualifie de « neutre » une souche qui n'est pas sensible à une toxine et qui n'en produit pas. Il est à noter que les qualificatifs phénotypiques « killer », « sensible », « neutre » s'appliquent toujours en référence à une toxine particulière (**Pommier, 2003 ; Maqueda et al., 2011**).

L'action d'une souche killer sur une souche sensible est facile à mettre en évidence au laboratoire, par culture sur milieu gélosé à pH 4.2 – 4.7 à 20 - 25 °C. Dans la plupart des cas, le milieu glucose-extrait de levure-peptone agar avec un tampon citrate-phosphate (0.1 M, pH 4.5) est utilisé (**Golubev., 2006**). La souche sensible est inoculée dans la masse de la gélose avant solidification ; la souche à tester est inoculée en stries ou en spots sur le milieu solidifié ; si elle est killer, une zone claire dans laquelle la souche sensible ne pousse pas autour de la culture de la souche à tester (Figure 5) (**Ribereau-Gayon., 2004**).



**Figure N° 05** : Mise en évidence sur milieu gélosé du phénotype killer contre deux isolats de *Candida albicans* (Polonelli et Conti, 2009)

**Tableau N° 04** : Espèces de levures pour lesquelles l'activité killer a été rapportée (Buzzuni et al., 2004 ; Golubev, 2006 ; Buzdar et al., 2011 ; Comitini et Ciani, 2011 ; Santos et al., 2011 ; Bajaj et al., 2012 ; Liu et al., 2012 ; Gou et al., 2013).

Espèce de levure	Référence	Espèce de levure	Référence
<i>Bullera alba</i>	<i>Candida versatilis</i>	<i>Kluyveromyces dobzhanskii</i>	<i>Rhodotorula lignophila</i>
<i>Bullera hanna</i>	<i>Cryptococcus aerius</i>	<i>Kluyveromyces lactis</i> ( <i>Candida sphaerica</i> )	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>
<i>Bullera sinensis</i>	<i>Cryptococcus albidus</i>	<i>Kluyveromyces marxianus</i> ( <i>Candida pseudotropicalis</i> )	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>Bullera unica</i>	<i>Cryptococcus laurentii</i>	<i>Kluyveromyces siamensis</i>	<i>Saccharomyces exiguus</i> ( <i>Candida holmii</i> )
<i>Candida albicans</i>	<i>Cryptococcus luteolus</i>	<i>Kluyveromyces wickerhamii</i>	<i>Saccharomyces paradoxus</i>
<i>Candida berthetii</i>	<i>Cryptococcus</i>	<i>Meyerozyma</i>	<i>Schizosaccharomyces</i>

	<i>nemorosus</i>	<i>guilliermondii</i> ( <i>Pichia guilliermondii</i> )	<i>pombe</i>
<i>Candida diversa</i>	<i>Cryptococcus perniciosus</i>	<i>Millerozyma farinosa</i> ( <i>Pichia farinosa</i> )	<i>Sporidiobolus pararoseus</i>
<i>Candida freyschussi</i>	<i>Cryptococcus podzolicus</i>	<i>Mrakia frigida</i>	<i>Schwanniomyces occidentalis</i>
<i>Candida glabrata</i>	<i>Curvibasidium pallidicorallinum</i>	<i>Pichia cactophila</i>	<i>Tetrapisispora phaffii</i>
<i>Candida. Homilentoma</i>	<i>Cystofilobasidium bisporidii</i>	<i>Pichia kluyveri</i>	<i>Torulaspora delbrueckii</i>
<i>Candida maltosa</i>	<i>Debaryomyces hansenii</i>	<i>Pichia membranifaciens</i>	<i>Torulaspora microellipsoides</i> ( <i>Zygosaccharomyces microellipsoides</i> )
<i>Candida naeodendra</i>	<i>Fellomyces penicillatus</i>	<i>Pichia kudriavzevii</i>	<i>Trichosporon asteroides</i>
<i>Candida oleophila</i>	<i>Filobasidium capsuligenum</i>	<i>Pseudozyma antarctica</i>	<i>Trichosporon jirovecii</i>
<i>Candida parapsilosis</i>	<i>Hanseniaspora</i>	<i>Rhodotorula</i>	<i>Ustilago maydis</i>

<i>uvarum (Kloeckera dairenensis apiculata)</i>			
<i>Candida silvae</i>	<i>Hanseniaspora valbyensis (Kloeckera japonica)</i>	<i>Rhodotorula glutinis</i>	<i>Wickerhamomyces anomalus (Pichia anomala)</i>
<i>Candida sonorensis</i>	<i>Hanseniaspora vineae (Kloeckera africana)</i>	<i>Rhodotorula graminis</i>	<i>Williopsis Saturnus</i>
<i>Candida stellata</i>	<i>Kluyveromyces aestuarii</i>	<i>Rhodotorula lactosa</i>	<i>Zygosaccharomyces bailii</i>

## **II Le sol**

### **1. Définition**

Le sol est défini comme la couche supérieure de la croûte terrestre composée des particules minérales, de matières organiques, d'eau, d'air et d'organismes (**NF ISO 15799,2004**). Cependant le sol est un milieu vivant, complexe et dynamique, en évolution constante sous l'effet de différents paramètres tels que le climat, la topographie, la végétation et l'action de l'homme. Il joue un rôle d'interface entre les phases liquides et gazeuses dans l'environnement où il intervient comme système source, système transformateur, et système de transfert des éléments en trace (**Berthelin et Leyval., 2000**).

Le sol est composé de constituants minéraux et organiques, d'eau et de gaz. Les constituants minéraux se divisent en deux catégories : des minéraux primaires résultant directement de la désagrégation de la roche mère, et des minéraux secondaires néoformés. Les matières organiques du sol, quant à elles, se composent d'une fraction organique vivante (flore du sol, faune et racines végétales) de taille grossière (20 mm), non évoluée et d'une fraction organique morte (des résidus d'origine animale et végétale) en perpétuelle évolution, composées de substances humiques (acides humiques, fulviques et humine se distinguant principalement par leur solubilité en fonction de la méthode d'extraction) et de biomolécules issus d'organismes non transformées (polysaccharides) (**Robert., 1996**).

### **2 .Constituants du sol**

Le sol est considéré comme un milieu poreux tri phasique rempli partiellement d'eau (phase liquide) et d'air, ou de vapeur d'eau (phase gazeuse). La phase solide est constituée des particules minérales agrégées de différentes tailles. C'est un milieu poreux dont la phase solide, constituée par des minéraux et des composés organiques, forme des assemblages plus ou moins volumineux et donne au sol sa structure. Cette phase solide n'est pas continue et délimite un espace poral de dimensions variés et de géométrie complexe. Cette caractéristique explique la présence de phases fluides, liquide et gazeuse, susceptibles de se déplacer et donner lieu à des flux de matières (**Henin S., 1976**).

### **2.1. La phase gazeuse**

La phase gazeuse d'un sol est constituée par les mêmes composants que ceux de l'air atmosphérique. Cependant à cause de l'activité biologique présente à l'intérieur des sols, les teneurs en chacun des composants peuvent changer considérablement (**Calvet ., 2003**). La composition de cette phase dépend aussi de la profondeur et du temps de renouvellement de l'air à l'intérieur du sol. Un exemple d'évaluation du mouvement des gaz dans les sols concerne l'estimation du transport de composés organiques volatiles sur des sites contaminés. A la surface du sol essentiellement, l'oxygène et le dioxyde de carbone ont un rôle important. En effet, la concentration en oxygène maintient les conditions d'aérobie ou d'anaérobie du sol, impliquées dans les conditions de survie des micro-organismes. L'aération des sols est très importante pour la croissance des racines des végétaux. Le dioxyde de carbone influence l'acidité du sol par sa transformation chimique sous forme de carbonate en réaction avec la phase liquide du sol. La composition de cette phase gazeuse du sol peut contrôler fortement la distribution et l'activité des communautés bactériennes des sols (**Soulas *et al.*,1983**).

### **2.2 .La phase liquide**

La phase liquide du sol est principalement constituée par l'eau de pluie, dans laquelle sont dissous les ions minéraux et les molécules organiques, qui font varier sa composition et sa vitesse de transfert d'un sol à l'autre. La composition de l'eau du sol dépend du milieu géologique avec lequel elle interagit chimiquement. Du point de vue de la réactivité chimique et biologique, le pH de l'eau du sol constitue une propriété majeure qui met en jeu l'ensemble des réactions biologiques et chimiques qui se déroulent dans le sol. La composition chimique de la phase aqueuse est régulée par des processus chimiques à l'interface roche-eau et atmosphère-eau, ainsi que par des processus biologiques tels que la photosynthèse ou la respiration. Les processus de dissolution des roches contrôlent la présence du Ca et du Mg qui proviennent des carbonates, mais aussi du Na et du K provenant des feldspaths et des micas ou des anions HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> et NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (**Sigg *et al.*, 2001**). Ces différentes réactions permettent la libération de nutriments et oligo-éléments, essentiels aux microorganismes du sol.

### **2.3. La phase solide**

Elle est constituée par des minéraux et des matières organiques en proportions variables. On pourrait considérer les organismes vivants du sol comme une partie de la phase

solide, puisqu'ils ne sont ni gazeux ni liquides (**Calvet R., 2000**). On distingue deux fractions dans le sol:

### **2.3.1. Fraction minérale**

Les minéraux constituent, en général, de 95 à 99% du sol. La composition minérale dépend de la nature de la roche-mère. La nature des minéraux peut être extrêmement diverse avec des tailles granulométriques différentes (**Quénéa K., 2004**).

-Sable ( $\varnothing = 2000$  à  $50 \mu\text{m}$ )

-Limon ( $\varnothing = 50$  à  $2 \mu\text{m}$ )

-Argile granulométrique ( $\varnothing < 2 \mu\text{m}$ )

La texture d'un sol correspond à la répartition des minéraux par catégorie de grosseur, indépendamment de la nature et de la composition de ces minéraux. Les sols sont classés suivant leurs proportions relatives en particules argileuses.

### **2.3.2. La fraction organique**

La fraction organique d'un sol est constituée à plus de 80% de matière organique morte (résidus de plantes et d'animaux en état de décomposition naturelle) (**Paul E. A. & Clark F. E., 1996**). On trouve aussi des organismes vivants : des bactéries dont beaucoup d'actinomycètes, des champignons et une microfaune formée de protozoaires, nématodes, insectes, vers de terre (**Quénéa K., 2004**).

Le sol est un habitat généralement favorable à la prolifération des microorganismes, leur nombre est supérieur à celui trouvé dans les eaux douces ou marines : la population microbienne s'élève à des valeurs comprises entre  $10^6$  et  $10^9$  bactéries par gramme de sol (**Artiola-Fortuny J. et Fuller W.H., 1982**). Leur abondance et leur nature dépendent du type de sol, de la végétation, du climat et des diverses actions anthropiques et de leurs variations (**Calvet R., 2000**). La profondeur est une variable écologique qui affecte significativement la survie des microorganismes. Dans les zones tempérées, si une grande partie d'entre eux se concentre dans le premier mètre de la couche superficielle, ce sont en fait les premiers centimètres qui en contiennent le plus grand nombre (**Crosinier J., 1999**).

Les bactéries et les champignons constituent les microorganismes les plus représentés dans les sols où ils sont les principaux responsables de la minéralisation des matières organiques (Quénéa K., 2004). Ils participent aussi à un processus appelé humification qui conduit à la formation de l'humus (Paul E. A. & Clark F. E., 1996). Qui est un composé complexe et majeur du cycle de la matière organique tellurique et de la fertilité du sol.

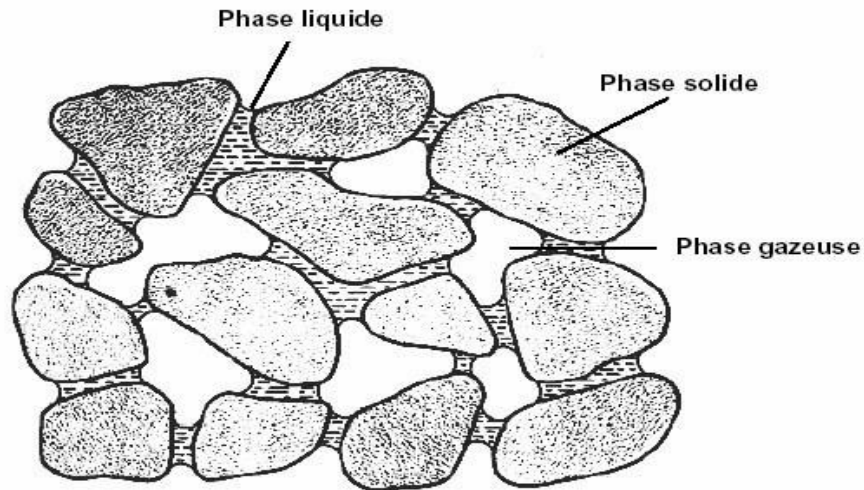


Figure N° 06 : Les trois phases du sol. (Mermoud ., 2006)

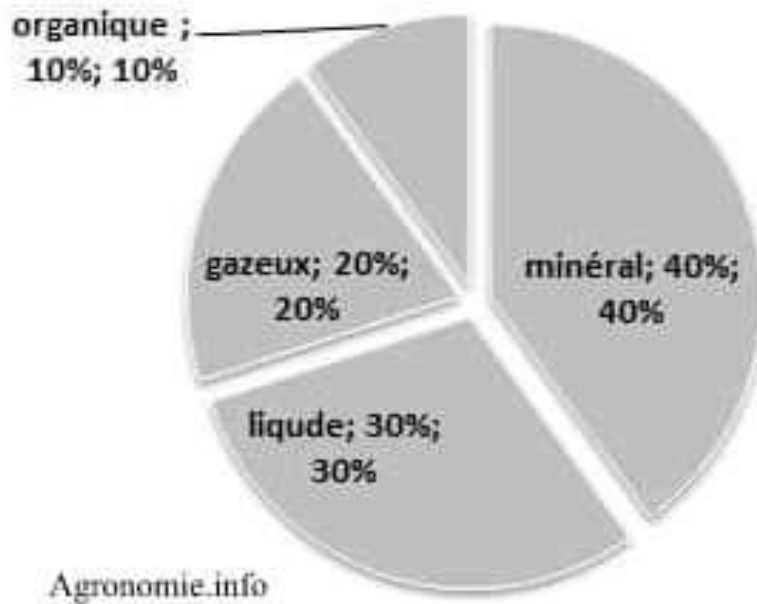


Figure N° 07 : Répartitions de la constitution des sols

#### **4. Microflore du sol**

Les organismes vivants du sol sont en excluant les racines et la méso-faune (proportion typique de biomasse entre parenthèse), les bactéries (25 %), les champignons (59 %), les algues (traces), les protozoaires (4 %) et la microfaune (12 %) (**Gobat *et al.*, 1998**). Les bactéries représentent les microorganismes les plus abondants dans le sol en densité et en nombre, même si les champignons représentent une quantité de biomasse plus importante. Les microorganismes du sol sont aujourd'hui reconnus comme étant un des facteurs clé dans l'évolution des sols.

##### **4.1. Bactéries**

Les bactéries sont les microorganismes les plus abondants et métaboliquement les plus actifs du sol. En fonction des propriétés du sol, tous les types physiologiques bactériens sont représentés : autotrophes et hétérotrophes, mésophiles, thermophiles et psychrophiles, aérobies et anaérobies. Les genres les plus communément isolés sont *Arthrobacter*, *Pseudomonas*, *Achromobacter* et *Bacillus*, dans les couches aérobies alors que les bactéries du genre *Clostridium* sont dominantes dans les conditions anaérobies. Les variations du potentiel nutritionnel du sol favorisent l'apparition de bactéries autotrophes du cycle de l'azote : *Nitrosomonas* et *Nitrobacter* et du soufre : *Thiobacillus*. (**Bousseboua *H.*, 2005**).

##### **4.2. Les champignons**

En général, les champignons du sol forment une biomasse aussi importante que celle des bactéries. Leurs activités métaboliques sont multiples et fondamentales à l'équilibre écologiques des sols, par : leurs interactions avec les systèmes racinaires des plantes, leur aptitude de colonisation et de dégradation des débris organiques de grande taille et des composés de structures complexes. De nombreux travaux indiquent la prédominance de : *Mucor*, *Trichoderma* et *Aspergillus*, alors que *Rhizopus*, *Fusarium*, *Zygorhynchus*, *Cephalosporium*, *Cladosporium* et *Verticillium* sont couramment isolés. (**Bousseboua *H.*, 2005**).

##### **4.3. Algues et protozoaires**

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

filamenteuses. Les groupes les plus courants sont des *Chlorophyceae*. Parmi les microorganismes photosynthétiques du sol, les Cyanobactéries sont dominantes dans les sols neutres et alcalins, alors que les algues sont les plus communes dans les sols acides (Bousseboua *H.*, 2005).

**Tableau N° 05** : Distribution des microorganismes en fonction du sol (Alexander, M., 1994)

Organismes/g de sol $\times 10^3$					
Profondeur (cm)	Bactéries aérobie	Bactéries anaérobies	Actinomycètes	Champignons	Algues
3-8	7800	1950	2080	119	25
20-25	1800	379	245	50	5
35-40	472	98	49	14	0,5
65-75	10	1	5	6	0,1
135-145	1	0,4	-	3	-

# *Matériels et Méthodes*

Cette étude a été réalisée aux laboratoires pédagogiques de l'université de Khenchela. Elle a pour but d'isoler, à partir de sol, des levures et d'étudier leurs activités antagonistes et hydrolytiques.

### 1. Echantillonnage

Les échantillons du sol utilisés pour cet objectif sont prélevés à partir de sol forestier ; Montagne de Nmamcha-Ouled Recheche- Khenchela. Une quantité de 10g de sol est prélevée à partir d'une profondeur de 10 cm à l'aide d'une spatule stérile puis, introduite dans des sachets stériles afin de les transporter jusqu'au laboratoire (**Rodriguez-Zaragoza *et al.*, 2005**) (**figure 8**).



**Figure N° 08 : Site de prélèvement du sol**

### 2. Isolement des levures

L'isolement des levures nécessite l'emploi des milieux sélectifs dotés des propriétés antibactériennes (**Guiraud., 1998**). Dans la présente étude, nous avons suivi la méthode décrite par **Moreira *et Vale* (2018)**, légèrement modifiée. Brièvement, 10 g de sol ont été homogénéisés dans 90 ml de milieu liquide MYPG (annexe1) dont le pH est ajusté à 5,6. La suspension a été homogénéisée à l'aide d'un agitateur pendant quelques minutes puis incubée à 30°C 24h. Cette suspension, d'enrichissement, est considérée comme solution mère et été utilisée pour produire des dilutions décimales dans de l'eau peptone à 0,1 %(annexe 2). Ces dilutions ont été étalées sur milieu solide MYPG et PDA (annexe1).

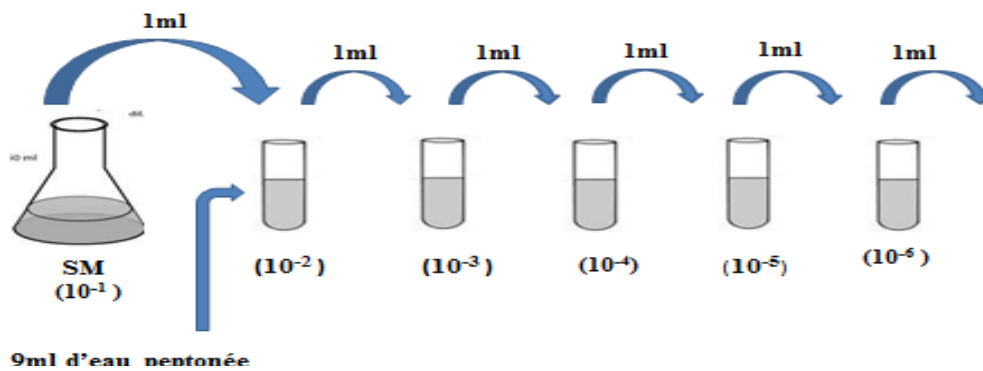
Un volume de 0.1 ml de chacune des dilutions indiquées est déposée sur des boites de Pétri contenant le milieu gélosé MYPG et PDA, puis étalé uniformément avec un râteau stérile par un mouvement de balayage et de rotation sur l'ensemble de la surface de la gélose. Au milieu

de culture, nous avons ajouté de la gentamicine (80mg mL<sup>-1</sup>) pour inhiber croissance bactérienne. Enfin, les boîtes sont incubées à 30°C pendant 5jours. Les étapes du protocole de l'isolement sont présentées dans la (**figure 09**).

## 1- Enrichissement



## 2- Les dilutions décimales



## 3- Etalement sur le milieu solide

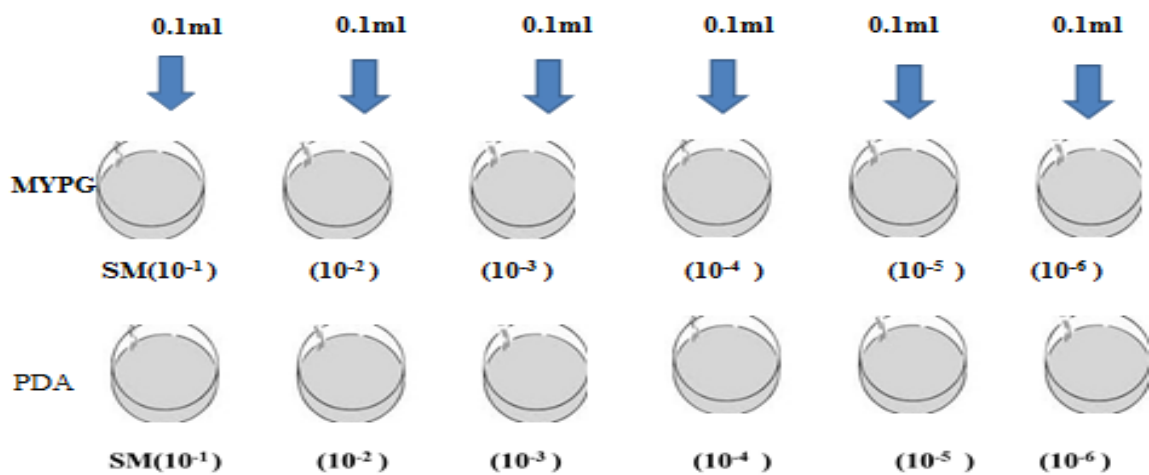


Figure N° 09 : Les étapes du protocole de l'isolement

### **3. Caractérisation partielle et sélection des isolats**

Après incubation, les colonies obtenues sont analysées et observées micro et macroscopiquement pour l'identification préemptive des levures et leur sélection pour la purification et les analyses ultérieures.

#### **3.1. Etude des caractères cultureux des levures**

##### **3.1.1 Identification macroscopique**

Les colonies obtenues ont été caractérisées morphologiquement comme décrit par **Dias et Schwan (2010)**, en observant des caractéristiques macromorphologiques telles que la couleur (blanc, beige, orange, rose, etc.), la taille (petite, moyenne ou grande), l'aspect de la colonie (pâteuse ou crémeuse), la forme du bord (lisse ou filamenteuse), et le profil (plat, convexe, haut).

##### **3.1.2. Purification**

Les colonies considérées comme levures sont purifiées par repiquage sur le même milieu de culture utilisé dans l'isolement par la méthode des stries. Les isolats sont étalés sur toute la surface de la gélose et l'incubation de toutes les boîtes est effectuée à 30°C de 48 à 72h.

### **4. Mise en évidence des activités hydrolytiques**

La capacité des levures sélectionnées à produire et à sécréter des enzymes lytiques a été testée sur des milieux solides contenant les substrats correspondants :

- **Activités amylolytiques**

La production des amylases a été testée sur milieu PDA (annexe1) contenant l'amidon soluble à 1%, comme seule source de carbone. Chaque isolat de levure purifiée est ensemencé sur le milieu sous forme d'une strie. Les boîtes sont ensuite incubées à 30°C pendant 48 à 72h. Après incubation, le milieu gélosé est recouvert d'une solution de lugol(annexe 2) pendant 30 secondes suivie d'un rinçage avec de l'eau distillée. L'hydrolyse de l'amidon est indiquée par l'apparition d'une zone claire autour de la zone de croissance (**Tatsinkou et al ., 2005**) .

- **Activités protéolytiques**

La gélose au lait (annexe 1) a été utilisée pour la mise en évidence de la présence d'une activité protéolytique. Chaque isolat de levure purifiée est ensemencé sur le milieu sous forme d'une strie. Les boîtes sont ensuite incubées à 30°C pendant 48 à 72h. La dégradation de protéines du lait se caractérise par l'observation visuelle et directe d'une zone de lyse transparente autour de la zone de croissance de la levure testée **Moreira et Vale (2018)**,

- **Recherche des activités Antagonistes**

Le pouvoir d'antagonisme des levures a été recherché suivant la méthode de double culture décrite par **Chen et al., (2018)** légèrement modifiée. Des contaminants appartenant au genre *Penicillium* ont été utilisés pour tester et évaluer l'activité antagoniste des levures sélectionnées. Chaque moisissures test est placée par touche à côté de la levure préalablement ensemencée par une strie de 5 cm de longueur environ sur un milieu PDA, puis incubées à 30°C pendant de 1 à 7 jours. Les milieux inoculés avec les isolats de moisissures test sans levure antagoniste servent de témoin négatif. Les observations incluent le pourcentage d'inhibition basé sur la détermination du diamètre de la colonie développée



**Figure N ° 10** : Contaminants de genre *Penicillium*

*Résultats*

*et*

*Discussion*

### 1. Isolement et identification partielle des levures

La présente étude avait pour objectif l'isolement de levures à partir d'un sol forestier des (Montagnes de Nemamcha situées dans la commune d'Ouled rechache de la wilaya de Khenchela. Cette région est caractérisée par un climat semi-aride sec et froid).

Selon **Phaff et Starmer (1987)**, l'estimation du nombre total des levures est de  $10^5$  à  $10^6$  /g de sol, suggérant qu'elles représentent un nombre faible, comparé à celui des bactéries et des moisissures de l'ordre de  $4 \times 10^6$  à  $7 \times 10^7$  /g de sol.

#### 1.1. Caractéristiques macroscopiques

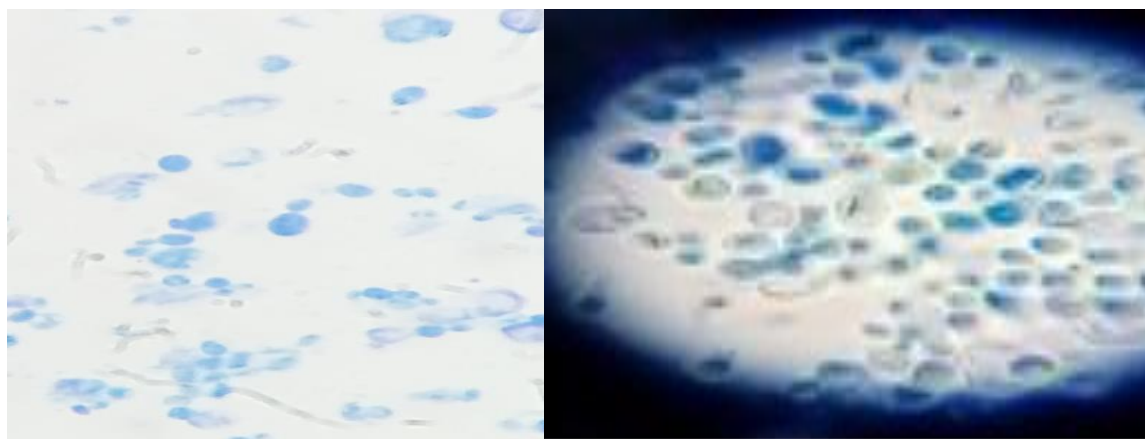
L'étude macroscopique des isolats sur milieux PDA et milieu MYPG après incubation pendant 5 jours à  $30\text{ C}^\circ$  (figure 11) , a permis de sélectionner des colonies en se basant sur leur forme , leurs tailles, leurs couleur et leur aspect .



**Figure N° 11** : Observation macroscopique des colonies

#### 1.2. Caractéristiques microscopiques

L'étude microscopique repose sur l'observation de différents critères tels que la forme et la taille des cellules sous microscope et la recherche du bourgeonnement, caractéristique de la reproduction chez les levures (figure12).



**Figure N° 12 :** Observation microscopique des levures (Grossissement x100)

L'ensemble des caractéristiques macroscopiques et microscopiques ont permis de sélectionner et purifier 6 isolats. L'ensemble de ces caractères sont résumés dans le (tableau6).

**Tableau N° 06 :** Caractéristiques macro et microscopiques des isolats sélectionnés

Isolat	Caractères macroscopiques	Caractères microscopiques
L1	Colonie petite taille, blanche, lisse, brillantes, crémeuse.	forme : Cellules sphériques à ovoïde. Reproduction : Bourgeoisement
L2	-Colonie petite taille, blanche, lisse, brillantes, crémeuse.	-forme : Cellules sphériques à ellipsoïdes.  -Reproduction :  bourgeoisement polaire
L3	-Colonie taille moyenne, blanche,	-forme : Cellules sphériques à

	lisse, brillantes, crémeuse.	ovoïdes.
<b>L4</b>	-Colonie de taille moyenne, blanche, lisse, brillantes, crémeuse.	-forme : Cellules sphériques à ellipsoïdes.  -Reproduction : bourgeonnement multilatérale
<b>L5</b>	-Colonie petite taille, blanche, lisse, brillantes, crémeuse.	-Cellules sphériques à ellipsoïdes
<b>L6</b>	-Colonie petite taille, blanche, lisse, brillantes, crémeuse.	-forme : Cellules sphériques  -Reproduction : bourgeonnement polaire

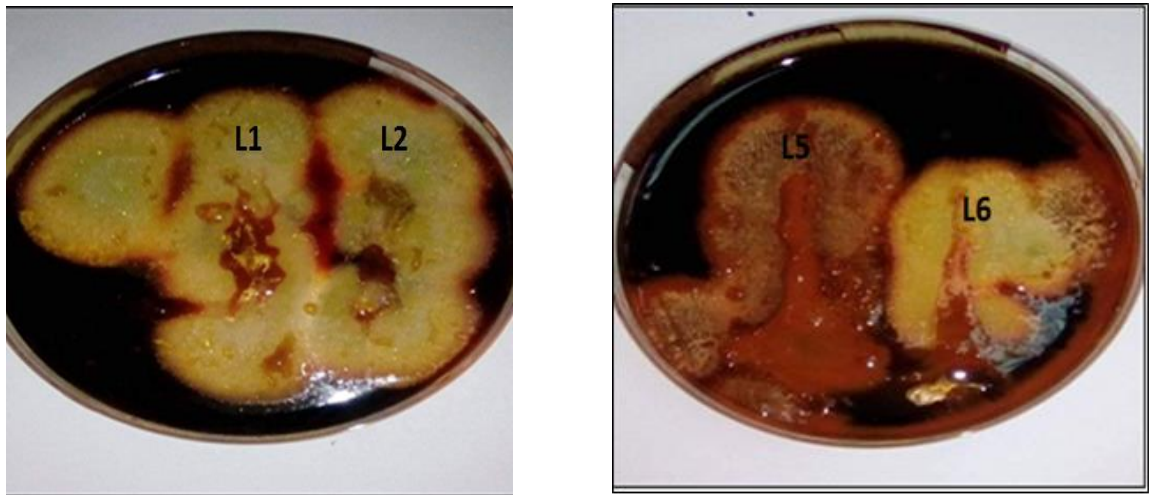
---

## 2. Détermination des activités hydrolytiques

### a) Activité amylolytique

Parmi les six isolats isolés et sélectionnés, L1, L2, L5 et L6 ont développé des zones de lyse (halo clair) sur ce milieu sélectif, cependant les deux restantes n'ont présenté aucune activité amylolytique (figure 13 et tableau 7). Ces résultats sont en accord avec l'étude décrite par **Merabti ., (2006)** , qui a permis de sélectionner 3 souches levuriennes à activité amylolytiques isolées à partir de sol saharien algérien. La souche S5 appartenant au genre *Lipomyces* se distingue par une activité amylolytiques élevée.

Les levures amylolytiques secrètent les amylases microbiennes qui sont actuellement parmi les enzymes les plus importantes dans les procédés industriels et alimentaires (industrie pharmaceutique, textile, papeterie et détergents), en raison de leur productivité et thermostabilité (**Burhan et al., 2003**) .



**Figure N° 13 :** Résultats de l'activité amyolytiques L1, L2, L5, L6.

**b) L'activité protéolytique**

Dans le présent travail, le criblage de l'activité protéolytique des souches levuriennes isolées de sol forestier a permis d'obtenir une seul souche positive L1 ,caractérisé par l'apparition d'un halo claire autour de la culture ( figure 10 ).



**Figure N° 12 :** Résultat de l'activité protéolytique de la souche L1 et L2

Les protéases sont des enzymes industrielles très importantes (hydrolases), comptent pour environ 60-65% des ventes totales dans le monde entier des enzymes en raison de leurs applications dans plusieurs secteurs industriels (**Chellappan *et al.*, 2006; Barnali *et al.*, 2008 ; Mukherjee *et al.*, 2008**).

Les principales industries utilisatrices de protéases sont : applications alimentaires, industrie des détergents, domaine pharmaceutique et médical, traitement des eaux usées industrielles et. Elles sont employées aussi avec des mélanges des enzymes hydrolytiques pour dégrader les polymères constitutifs de la matière végétale servant pour l'alimentation animale (**Aviron *et al.*, 1982**). Nos résultats sont en accords avec l'étude décrite par **Maamar F.,(2017)** sur la caractérisation des enzymes protéolytiques de 4 levures isolées à partir de sol saharien d' El Oued .

### **3. Pouvoir d'antagonisme des levures**

Les résultats obtenus par notre étude montrent que les six isolats sont incapables d'exercer une activité antagoniste contre les souches fongiques testées et sont considérées comme neutres. Par ailleurs, les levures présentes dans l'environnement sont décrites comme de puissants antagonistes de différents agents pathogènes des plantes. En effet de nombreuses espèces levuriennes possédant une activité antagoniste qui contribuent à l'efficacité du contrôle biologique contre divers maladies post récolte des fruits ont été rapportées (**Li *et al* ., 2016**).

Les travaux de **Bodmmer., (2017)** avaient décrit et caractérisé des levures (40 isolats) et leur effet antagoniste sur 16 champignons filamenteux. Ces levures, isolées du sol, ont réprimé les champignons plus fortement que les levures de la phylosphère et l'activité antagoniste était une propriété spécifique à l'espèce/souche et ne dépendait pas du champignon filamenteux avec lequel une levure interagissait.

**Tableau N° 07** : Résultats des activités hydrolytiques et l'antagonisme

<b>Souches</b>	<b>Activité protéolytiques</b>	<b>Activité amylolytiques</b>	<b>Antagonisme</b>
<b>L1</b>	+	+	-
<b>L2</b>	-	+	-
<b>L3</b>	-	-	-
<b>L4</b>	-	-	-
<b>L5</b>	-	+	-
<b>L6</b>	-	+	-

*Conclusion et*

*Perspectives*

Les levures représentent un groupe important de microorganismes exploités dans différents domaines.

La présente étude comporte l'isolement et l'identification partielle de souches levuriennes isolées à partir de sol forestier de la région d'Ouled Rechech –Khenchela. Les isolats sélectionnés et caractérisés ont été évalués afin de rechercher leurs aptitudes antagonistes et hydrolytiques. (Amylolytiques et protéolytiques).

Pour ce faire, l'isolement a été réalisé sur les milieux solides MYPG et PDA précédé d'un préenrichissement sur un bouillon MYPG. L'étude des caractères macroscopiques et microscopiques a permis de répertorier 06 isolats (L1, L2, L3, L4, L5, L6). La recherche des levures amylolytiques sur milieu PDA additionné d'amidon soluble a révélé 4 souches (L1, L2, L5 et L6) sécrétant des amylases exocellulaires. Toutefois, une seule (L1) levure sur les six testées a présenté des capacités protéolytiques sur une gélose au lait et aucune activité antagoniste envers les contaminants testés n'a été observée.

L'ensemble des résultats obtenus nous permettent de conclure que les levures isolées à partir de sol forestier de la région de Khenchela Possèdent des activités enzymatiques intéressantes, notamment protéolytiques et amylolytiques. Ces dernières méritent d'être complétées par d'autres travaux pour une caractérisation approfondie.

*Références*

*Bibliographiques*

## A

- **Aiyer P. V.** *Amylases and their applications.* *African Journal of Biotechnology*, 2005, 4(13): 1525- 1529.
- **Alexander, M., (1994).** *Biodegradation and Bioremediation.* Academic Press, New York (USA).and sensorial properties of young wines. *Food Microbiology.* Vol. 69 : 51–63.
- **Artiola-Fortuny J. & Fuller W.H., (1982).** *Adsorption of some mono-hydroxybenzene derivatives by soils.* *Soil Science*, 133: 218-227.
- **Aviron-Violet, P., Baret, J.L., Bertrand, C., Blazy, B., & Bouvier, F., (1982).** *Les enzymes : Production et utilisation industrielles.* Bordas, Paris. pp. 23; 123; 140–153.

## B

- **Babjeva I.P., Moavad K and Marchenko A.I., (1977).** *Microbiologica.* 46, p :270.
- **Bajaj B.K., Raina S., Singh S., (2012).** *Killer toxin from a novel killer yeast Pichia kudriavzevii RY55 with idiosyncratic antibacterial activity.* *Journal of Basic Microbiology*, 52:1–11.
- **Barnali, R. B., Ajit B. K., & Manas D., (2008).** *Production and characterization of extracellular protease of mutant Aspergillus niger AB100 grown on fish scale.* *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24:449–455.
- **Barnett J. A., Payne R. W. and Yarrow D.,(2000).** *Yeast: Characteristics and identification.* Third edition 2000 reprinted 2007. Cambridge University Press.
- **Barnett, J.A., Payne, R.W. et Yarrow, D., (1990).** *Yeasts: chara identification.* 2nd Edition, Cambridge University Press, pp.1-2.

- **Berthelin, J., et Leyval, C., (2000).** Contamination des milieux par les éléments en traces. Les conséquences sur les sols et les eaux superficielles. Citation .Reports. Agriculture. Fr., 86, 25-37.
- **Bevan E.A., Makover M., (1963).** The physiological basis of the killer character in yeast. In: Geers S.G. (Eds), Proc XIth Int Congr Genet. Pergamon Press, Oxford, pp. 202-203.
- **Boiron P., (1996).** Organisation et biologie des champignons .Edition Nathan.p :13-35.
- **Boiron P., (1996).** Organisation et biologie des champignons. Nathan. Paris. P. 19-79
- **Botton B., (1991).** La physiologie des levures Ds : Larpent J.P., Biotechnologie des levures. Masson, Milan Barcelone Bonn. Paris. p : 97-127.
- **Botton., B., (1991).** La physiologie des levures. In: Larpent J. P. (ed.), Biotechnologie des levures. Paris: Edition Masson.
- **Bouix .M. et Leveau J-Y., (1991).** Les levures .Techniques d'analyse et de contrôle dans les industries agroalimentaires, édition 2 Lavoisier-Tec & Doc, Paris. 3. PP: 206-229.
- **Bouix M., Leveau J. Y., (1991).** Techniques d'analyse et de contrôle dans les industries agroalimentaires, édition 2 Lavoisier-Tec & Doc, Paris. 3:206-229.
- **Bouix Met Leveau J. Y., (1991).** Les levures Ds : Bourgeois C.M., Leveau J.Y, Techniques d'analyse et de contrôle dans les industries agroalimentaires, édition 2 Lavoisier Tec & Doc, Paris. 3, p : 206-229.
- **Bourgeois. C-M, Mescle. J-F, Zucca. J., (1996).** Microbiologie alimentaire Tome 1 : Aspect microbiologique de la sécurité et de la qualité des aliments. 2 ème Edition Ed. Tec & Doc. PP: 672.
- **Bousseboua H., (2005).** Eléments de microbiologie. Campus-Club, Algérie,(2ème Edition), 179- 199.

- **Burhan A., Nisa U., Gokhan C., Ömer C., Ashabil A and OsmanG., (2003).** *Enzymatic properties of a novel thermostable, thermophilic, alkaline and chelator resistant amylase from an alkaliphilic Bacillus Sp. Isolate ANT-6. Process Biochemistry.* 38, p: 1397-1403.
- **Buzdar M.A., Chi Z., Wang Q., Hua M.X., Chi Z.M., (2011).** *Production, purification, and characterization of a novel killer toxin from Kluyveromyces siamensis against pathogenic yeast in crab. Applied Microbiology Biotechnology,* 91:1571-1579.
- **Buzzini P., Corazzi L., Turchetti B., Buratta M., Martini A., (2004).** *Characterization of the invitro antimycotic activity of a novel killer protein from Williopsis saturnus DBVPG 4561 against emerging pathogenic yeasts. Federation of European microbiological societies Microbiological Letters,* 238:359–365.

## C

- **Calvet R., (2000).** *Le sol propriétés et fonctions, constitution et structure, phénomènes aux interfaces. Tome 1. Edition France Agricole. Paris (France),* 83-90.
- **Chalutz E. & C.L. Wilson., (1990).** - *Postharvest biocontrol of Green and blue and sour rot of citrus fruit by Debaryomyces hansenii. Plant Diseases,* 74, 134-137.
- **Chellappan S., Jasmin C., Basheer S.M., Elyas K.K., Bhat S.G., M. Chandrasekaran M., (2006).** *Production, purification and partial characterization of a novel protease from marine Engyodontium album BTMFS10 under solid state fermentation. Process. Biochemistry,* 41; 956–961.
- **Chen K., Escott C., Loira I., Fresno J. M., Morata A. et Tesfaye W., (2018).** *Use of non- Saccharomyces yeasts and oenological tannin in red winemaking: Influence on colour, aroma. Journal of Multivariate Analysis,* 167:378-394.
- **Clarke, P.H., & Steel, K.J., (1966).** *Rapide and simple biochemical tests for bacterial identification. Academic press. London. P.111*

- **Comitini F., Ciani M., (2011).** *Kluyveromyces wickerhamii* killer toxin: purification and activity towards *Brettanomyces/Dekkera* yeasts in grape must. *Federation of European microbiological societies Microbiological Letters*, 316:77-82.
- **Crosnier J., (1999).** *Devenir de la pollution métallique drainée par les eaux pluviales, influence du compartiment microbien et des alternances de dessiccation/réhumectation sur le transfert du zinc dans la zone non saturée du sol.* Thèse de Doctorat. Université de Claude Bernard – Lyon I (France).
- **Curl E A., Truelove B., (1986).** *The rhizosphere, advanced series in agriculture sciences.* Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 288.

### D

- **Davet P., (1996).** *Vie microbien du sol et production végétale.* Ed INRA .Paris.p383.
- **Dias DR, Schwan RF.** *Isolamento e identificação de leveduras.* In: *Moreira FMS, Huising EJ, Bignell DE, editores. Manual de biologia dos solos tropicais: amostragem e caracterização da biodiversidade.* Lavras: Editora UFLA; 2010. p. 227-77.

### E

- **El-Ghaouth A., J.L. Smilanick, G.E. Brown, A. Ippolito, M. Wisniewski & C.L. Wilson ., (2000).** *Application of Candida saitoana and glycolchitosan for the control of postharvest diseases of apples and citrus fruit under semi-commercial conditions.* *Plant Diseases*, 84, 243-248.

### F

- **Fossi Bertrand Tatsinkou, Tavea Frederic and Ndjouenkeu Robert.** *Production and partial characterization of a thermostable amylase from ascomycetes yeast strain isolated from starchy soils.* *African Journal of Biotechnology*, 2005, 4(1): 14-18.

## G

- **Golubev W.I., (2006).** *Antagonistic interactions among yeasts.* In: Rosa C.A., Péter G. (Eds) *Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts.* Springer, Berlin, pp 197–219.
- **Goretti M., Turchetti B., Buratta M., Branda E., Corazzi L., Vaughan-Martini A., Buzzini P., (2009).** *In vitro antimycotic activity of a Williopsis saturnus killer protein against food spoilage yeasts.* *Internatinal Journal of Food Microbiology*, 131:178–182.
- **Gobat JM., Havlicek E., Gillet F., (1998).** *Réflexions sur les relations sol-végétation : trois exemples du jura sur matériel allochtone .**Ecologie* 29 (4),535 .
- **Guiraud J. P., (1998).** *Microbiologie alimentaire.* Dunod, Paris. 310-321.
- **Guo F.J., Ma Y., Xu H.M., Wang X.H., Chi Z.M., (2013).** *A novel killer toxin produced by the marine-derived yeast Wickerhamomyces anomalus YF07b.* *Antonie van Leeuwenhoek*,103: 737–746.

## H

- **Hagler A.N and Mendonca H .L., (1981).***Applied and environmental Microbiology* .41,p:173.
- **Hencke, S., (2000).** *Utilisation alimentaire des levures. Mémoire de Docteur en Pharmacie, université Henri Poincare, Nancy i.*
- **Henin, S., (1976).***Cours de physique du sol. Ed ORSTOM: 159P.*
- **Hilber-Bodmmer M, Schmid M, Ahrens CH, Freimoser FM.** *Competition assays and physiological experiments of soil and phyllosphere yeasts identify Candida subhashii as a novel antagonist of filamentous fungi.* *Molecular and Cellular Biology Microbiology.* 2017 Jan 5; 17(1):4. doi: 10.1186/s12866-016-0908-z. PMID: 28056814; PMCID: PMC5216558.

- <https://agronomie.info/fr/tag/cours/>

### K

- **Kreger Van, N. J., (1984).** *The yeast, a Taxonomic Study (Ed: 3).* Amsterdam: Cletus P. Kurtzman et Jack W. Fell.
- **KregerVan N. J., (1984).** *The Yeast, a Taxonomic Study, Elsevier Biomedical. Press, Amsterdam.*
- **Kresze G. B., (1991).** *Proteases during purification.* *Bioprocess-technol.* 12. 85-120.
- **Kwonchung K. J., Bennett J.E., (1992).** *Médical Mycology.* Lea & Febiger, Philadelphia. Press, Amsterdam.

### L

- **Larpent G .M and Sanglier J. J., (1992).** *Biotechnologies. Principes et méthodes.*p:574- 581.
- **Larpent J. P., (1991).** *Biotechnologie des levures, Masson, Milan Barcelone Bonn. Paris*127.
- **Larpent J.P et Gourgaud M., (1990).** *Mémento technique de microbiologie. Paris.* p417.
- **Larpent, J. P., (1990).** *Biotechnologie des levures. Paris: Edition Masson.*
- **Larpent, L. P. ET Larpent-Gourgaud, M., (1997).** *Mémento technique de microbiologie, 8ème éd. Paris: Edition Techniques et documentation-Lavoisier.*
- **Leclerc H., Meyer A. et Deiana J., (1995).** *Cours de microbiologie général. Nouveau programme. Biosciences et Techniques, édition, Paris. pp73-92.*
- **Leclerc, H., Meyer, A. ET Deiana, J., (1995).** *Cours de microbiologie générale: Nouveau programme, Biosciences et Techniques. Paris: Doin Editeurs.*

- **Leveau J.X. et Bouix M., (1982).** *Cinétique microbienne. In: SCRIBAN R. Biotechnologie ; Paris technique et documentation LAVOISIER/ MANIL (P) : « L'utilisation des microbes ». 1968. Collection QSJ N°1322. Presse Universitaire de France.*
- **Li B, Peng H, Tian S.** *Attachment Capability of Antagonistic Yeast *Rhodotorula glutinis* to *Botrytis cinerea* Contributes to Biocontrol Efficacy. Frontier in Microbiology. 2016 May 3;7:601. doi: 10.3389/fmicb.2016.00601. PMID: 27199931; PMCID: PMC4853683.*
- **Lim S.L., Tay S.T., (2011).** *Diversity and killer activity of yeasts in Malaysian fermented food samples. Tropical Biomedecine, 28: 438-443.*
- **Little ., A. D., (2004).** *Comité Biotechnologies de LEEM.*
- **Liu GL., Wang K., Hua M.X., Buzdar M.A., Chi Z.M., (2012).** *Purification and characterization of the cold-active killer toxin from the psychrotolerant yeast *Mrakia frigida* isolated from sea sediments in Antarctica. Process Biochemistry, 47:822-827.*
- **Liu S.Q., Tsao M., (2009).** *Inhibition of spoilage yeasts in cheese by killer yeast *Williopsis saturnus* var. *saturnus*. International Journal of Food Microbiology, 131: 280–282.*
- **Lodder J., (1971).** *The yeasts, a taxonomic study, 2ème edition. North Holland, Amsterdam, Londres.*
- **Lourens K and Reid G., (2002).** *Yeast nutrient management in winemaking. The Australian & New Zealand Grape grower & Winemaker. Annual Technical Issue. P: 50 - 54.*

## M

- **Maamar. F.,(2017).** *Caractérisation des enzymes protéolytiques des souches fongiques isolées à partir du sol saharien. Eloued : Université Echahid Hamma Lakhdar -El OUED, 2017 ,105 .*

- **Manyri L ., (2005).** *Analyse automatique d'image de population microbienne. Thèse de doctorat, Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse.*
- **Maqueda M., Zamora E., Álvarez M.L. Ramirez M., (2012).** *Characterization, ecological distribution, and population dynamics of Saccharomyces sensu stricto killer yeasts in the spontaneous grape must fermentations of southwestern Spain. Applied and Environmental Microbiology, 78:735-743.*
- **Mari M. & M. Guizzard ., (1998).** *The postharvest phase: emerging technologies for the control of fungal diseases. Phytoparasitica, 1, 59-66.*
- **Merabti R., (2006).** *Isolement et caractérisation de souches levuriennes amylolytiques à partir de sol saharien algérien. Thèse magister en Biochimie et microbiologie appliquées, université Mentouri, Constantine, 85 p.*
- **Meyer, A., Deiana, J. ET Bernard, A., (2004).** *Cours de microbiologie générale avec problèmes et exercices corrigé. Paris: Doin Editeurs.*
- **Moreira FMS, Huising EJ, Bignell DE.** *A handbook of tropical soil biology: sampling & characterization of below-ground biodiversity. London: Routledge; 2008.*
- **Moreira GAM, Vale HMM.** *Occurrence of yeast species in soils under native and modified vegetation in an iron mining area. Revista Brasileira de Ciennca do Solo. 2018; 42:e0170375.*
- **Morvan., J. (2010).** *Marché européen des enzymes dans les applications alimentaires. M55B. <http://www.frost.com>.*
- **Mukherjee, A. K., Adhikari H., & Rai S.K., (2008).** *Production of alkaline protease by a thermophilic Bacillus subtilis under solid-state fermentation (SSF) condition using Imperata cylindrical grass and potato peel as low-cost medium: characterization and application of enzyme in detergent formulation. Biochemical Engineering Journal, 39: 353-361.*
- **Mushtaq M., Nahar S., Hashmi M.H., (2010).** *Screening of killer-sensitive-pattern (KSP) forbiotyping of yeast strains isolated from slime fluxe of trees and flowers' nectar. Pakistan Journal of Botany., 42: 4313-4327, 2010.*

## N

- **Nasraoui .,(2006).***Les champignons parasites des plantes cultivées. Centre universitaire Tunis.p 450.*
- **Nf iso15799 (X31-603)., (2004).** *Qualité du sols–Lignes directrices relatives à la caractérisation éco toxicologique des sols et des matériaux du sol.*

## O

- **Oteng-Gyang K., (1984).***Introduction à la microbiologie alimentaire dans les pays chauds. Technique & Documentation Lavoisier, Paris. 8, p : 43-51.*
- **Oteng-Gyang K., Moulin G. and Golzy P.** *Effect of medium composition on excretion and biosynthesis of the amylases of Schwanniomyces castellii. European Journal Applied Microbiology and Biotechnology. 1980, 9: 129-132.*

## P

- **Paul E. A. & Clark F. E., (1996).** *Soil microbiology and biochemistry. 2nd edition. Academic Press. San Diego, California (USA), 340.*
- **Phaff. H, William. T, Starmer. H et Kricher .J., (1978).** *Evolution and Speciation of host plant specific. Widmer Tanner, F.A. Loewus. PP: 137- 149.*
- **Phaff H .J and Starmer W.T., (1987).** *Yeasts Associated with Plants, Insects and Soil In: Rose A.H., Harrison J.S. (Eds), the yeasts, VI, Biology of yeast. 2nd edition Academic Press. Londres. P: 123-174.*
- **Phaff H.J., Miller M.W and Mrak E.K., (1968).***The life of yeasts.In:Oteng-Gyang K. Introduction à la microbiologie alimentaire dans les pays chauds. Technique &Documentation Lavoisier, Paris. 8, p : 43.*

- **Pol D., (1996).** *Travaux pratiques de biologie des levures. Guide de laboratoire.* Ellipses édition marketing S.A, p 38.
- **Pol D., (1999).** *Travaux pratiques de biologie des levures : avant-propos et introduction [en ligne].* Ed Ellipses. Disponibles sur:, (consulté le 12.11.2014).
- **Polonelli L., Conti S., (2009).** *Biotyping of Candida albicans and Other Fungi by Yeast Killer Toxins Sensitivity.* In: Cihlar R.L., Calderone R.A. (Eds), *Candida albicans: Methods and Protocols.* Springer Science Business Media, pp. 97-115.
- **Pommier S., (2003).** *Dynamique de populations microbiennes en culture mixte : étude expérimentale en bioréacteur à membranes et modélisation du phénomène killer chez Saccharomyces cerevisiae.* Thèse de doctorat, Institut National Polytechnique de Toulouse.France.

## Q

- **Quénéa K., (2004).** *Etude structurale et dynamique des fractions lipidiques et organiques réfractaires de sols d'une chronoséquence forêt/maïs (CESTAS, Sud-ouest de la France).* Thèse de Doctorat. Université de Paris 6 (France).

## R

- **Ribereau-Gayon P., Dubourdiou D., Donèche B., Lonvaud A., (2004).** *Traité d'oenologie.*Dunod, Paris, pp.26-57.
- **Riviere J., (1975).***Les applications industrielles de la microbiologie. Collection Sciences agronomiques. Masson et Cie (ed.), p : 31-195.*
- **Robert, M., (1996).***Le sol : Interface dans l'environnement, ressource pour le développement.* Paris : Masson. 244 p.

- **Rodriguez-Zaragoza, S., Mayslish, E. et Steinberger, Y., (2005).** *Vertical Distribution the free living Amoeba Population in soil under desert Shrubs in the Negev.* *Applied Environmental Microbiology.* 71(4): 2053-2060.
- **Rose, A.H. et Harrison, J.S., (1987).** *The yeasts: yeasts and the environment.* Rose and Harrison eds, 2nd ed., vol 2, Academic Press, London.

## S

- **Santos A., Navascués E., Bravo E., Marquina D., (2011).** *Ustilago maydis killer toxin as a new tool for the biocontrol of the wine spoilage yeast Brettanomyces bruxellensis.* *International Journal of Food Microbiology,* 145:147–154.
- **Scriban R.** *Biotechnologie, Paris : tec & Doc- Lavoisier, 1984, 5è éd, 806p.*
- **Sicard P., (1982).** *Applications industrielles des enzymes.* In : Durand G. & Monson P. (Ed): *Les enzymes production et utilisation industrielles.* Ed. Gauthier-Villars. 121-164.
- **Sigg, L., Behra, P. & Stumm, W., (2001).** *Chimie des milieux aquatiques chimie des eaux naturelles et des interfaces dans l'environnement.* 3e edn. Dunod, Paris.
- **Simon P., Meunier R., (1970).** *Microbiologie industrielle et génie biochimique.* Masson ETCIE, éditeurs, paris. 31-47: 385-411.
- **Site:** <https://www.aquaportail.com/definition-4043-antagonisme-microbien.html>
- **Starmer W.T., Lachance M.A., (2011).** *Yeast ecology.* In: C.P. Kurtzman., J.W. Fell., T. Boekhout (Eds), *The Yeasts, a Taxonomic Study.* Elsevier, London, pp. 65-83.
- **Soulas,G.,Codaccioni,P.et Fournier ,J.C.,1983.***Effect of cross treatment on the subsequent breakdown of 2,4 -D,MCPA and 2,4,5-T in the soil . Behaviour of the degrading microbial populations.* *Chemosphere,* 12(7/8):1101-1106.

## T

- **Tatsinkou F.B., Taveai F and Ndjouenkeui R., (2005).** *Production and partial characterization of a thermostable amylase from ascomycetes yeast strain isolated from starchy soils. Africcan Journal of biotechnology. 4(1), p: 14-18*

### V

- **Van der Walt J.P and Yarrow D., (1984).** *In The yeasts, a Taxonomic Study (N.J.W. KregerVan Rij, ed.), Elsevier Biochemical Press, Amsterdam. p :45-104*
- **Van der Walt J.P., (1970).** *In The yeasts, a Taxonomic Study. (J. Lodder, ed.).North-Holland Publishing Co., Amsterdam and London. p : 555-718.*
- **Vishniac .H-S and Hempfling .W-P., (1979).** *Journal of General Microbiology .PP: 112:301.*

### W

- **Walker G., (2000).** *The role of metal ions in optimising yeast fermentation performance.In: Nutritional aspects II. Synergy between yeasts and bacteria.allemand Technical Meeting.p:27-30. .*
- **Walker G.M., Wiley J. and Chihster S., 1997.** *Yeast physiology and biotechnology*
- **Wickerham L .J., (1951).***Taxonomy of yeasts. Technical Bulletin No. 1029, United States. Department of Agriculture, Washington, D.C.*

# *Annexes*

**Annexe N°01**

➤ **Milieu YPG**

Eau distillé.....	500 ml
Glucose .....	5g
Peptone.....	2,5g
Agar .....	10g
Extrait de levure.....	1,5g
Extrait de malt.....	1,5g

➤ **Milieu PDA**

PDA .....	19,5g
Eau distillé.....	500g

➤ **Gélose au lait :**

Lait.....	30ml
Agar.....	2g
Eau distillé.....	70ml

➤ **Milieu de l'activité amylolytique**

Eau distillé.....	500ml
Extrait de levure .....	1,5g
Extrait de malt.....	1,5g
Peptone.....	2,5g
Amidon soluble.....	5g
Agar.....	10g

**Annexe N° 0 2**

➤ **Eau peptone:**

Eau .....	90ml
Peptone.....	0,25g

➤ **Lugol**

Iode .....	5g
Io dure de potassium.....	10g
Eau distillé .....	1ml