

SELECTION DE MYCETES A PARTIR D'ALIMENTS DE BETAIL PRODUCTEURS DE CATALASE EXTRACELLULAIRE ET DE SUBSTANCES ANTI-BACTERIENNES

Reçu le 21/10/2003 – Accepté le 31/12/2004

Résumé

L'examen des échantillons d'aliment de bétail de différentes origines (Ain M'lila, El Harrouch, Guelma et El khroub) a abouti à 166 isolats regroupés en 13 genres. La méthode de diffusion sur un milieu gélosé utilisée pour la détection des substances produites par les isolats, permet l'analyse de plusieurs souches sur la même boîte. Les résultats sur l'activité antibactérienne montrent une action inhibitrice élevée des isolats *Aspergillus flavus*, *A. fumigatus*, *A. ochraceus*, *Penicillium chrysogenum*, *P. cyclopium* et *P. viridicatum* par rapport aux autres isolats. La recherche de l'activité catalytique a visé à établir une éventuelle corrélation entre les deux sécrétions.

Mots clés: Aliment de bétail, Mycètes, Substances antibactériennes, Catalase extracellulaire

Abstract

Samples of feed stuffs were collected from factories situated in the following places: Ain M'lila, El Harrouch, Guelma and El Khroub. 166 fungal isolates were obtained and classified into 13 different genera. The agar plat screening method used to detect substances secretion by the isolates, turn to be very sensitive, and a large number of colonies can be screened in a single plate. The ability of these isolates to secrete antibacterial substances was investigated, the following isolates: *Aspergillus flavus*, *A. fumigatus*, *A. ochraceus*, *Penicillium Chrysogenum*, *P. cyclopium*, *P. viridicatum* were found to produce a secretion which had the best effect on bacteria test. The production of extracellular catalase by isolates was also investigated.

Keywords: Food stuff, Mycetes, Antibacterial substances, Extracellular Catalase.

N. KACEM-CHAOUCHE

L. DEHIMAT

Z. MERAIHI

Laboratoire de Génie

Microbiologique et Applications

Département de Biologie

Faculté des Sciences

Université Mentouri

Constantine (Algérie)

ملخص

خلص اختبار عينات أعلاف الحيوان من مصادر مختلفة (عين مليلة، الحروش، قالمة والخروب) إلى عزل 166 عذلة فطرية تنتمي إلى 13 جنس. كانت طريقة الانتشار في الأجار المتبعة لتحديد المواد المنتجة بواسطة العزلات الفطرية فعالة وتسمح باختبار العديد من العزلات في نفس التطبيق.

حددت السمية على أساس البحث عن الأثر المضاد للبكتيريا الناتج عن الفطريات على بكتيريا الاختبار. بين تحليل النتائج الأثر التنبيطي المرتفع للعزلات الفطرية *A. ochraceus*, *A. fumigatus*, *Aspergillus flavus* و *P. cyclopium*, *Penicillium chrysogenum* و *viridicatum* مقارنة بتأثير باقي العزلات الفطرية. حددت من جهة أخرى، العزلات الفطرية المنتجة لانزيم الـ Catalase خارج خلوي لبحث العلاقة بين الإفرازين.

الكلمات المفتاحية: علف الحيوان، الفطريات، المنتجات الأبيضية الثانوية، كاتالاز، خارج خلوي.

La plupart des écosystèmes et des milieux naturels, en particulier les aliments ou produits manufacturés, sont contaminés par des mycètes. On dénombre actuellement plus de 120.000 espèces, parfois utiles mais souvent indésirables [1]. Le développement des industries agro-alimentaires, la répartition irrégulière et saisonnière des productions agronomiques, nécessitent souvent une étape de stockage. Au cours de ce stockage, le risque de contamination et d'altération par les mycètes augmente surtout si les conditions d'entreposage sont mal respectées. Les aliments du bétail, par leur richesse en sucres fermentescibles et en vitamines [24] (orge, soja, colza, caroube et maïs) constituent un milieu favorable pour le développement et la fructification de mycètes.

Les mycètes sont des micro-organismes chimiohétérotrophes, généralement peu exigeants. Leur croissance peut se faire au dépend des sels minéraux et d'une substance organique jouant le rôle d'une source de carbone et d'énergie. Ils sont redoutables par leur tolérance à des pH plutôt acides, à des températures allant de 0° C à plus de 42° C et à une faible hygrométrie. Par ailleurs, ils se distinguent des bactéries du point de vue structural et métabolique par la sécrétion de nombreux métabolites qualifiés de secondaires non indispensables à la croissance et dont le rôle physiologique n'est pas encore élucidé. Par leur présence et par leurs sécrétions, ils peuvent être nuisibles à la santé humaine et animale [23]. En revanche, ils offrent des possibilités d'applications biotechnologiques très étendues. En plus de la production de biomasse, ils synthétisent des enzymes à intérêt industriel et donc commercial. Sur plus de 2000 enzymes produites, 40 % sont d'origine fongique [6]. Les mycètes produisent des enzymes intracellulaires et extracellulaires.

L'excrétion d'enzymes est prépondérante et la récupération de ces protéines est moins coûteuse.

La catalase (H_2O_2 oxidoreductase, EC 1.11.1.6) est une enzyme endocellulaire qui décompose le peroxyde d'hydrogène en oxygène et eau, utilisée dans différentes applications industrielles et pharmaceutiques. Cependant, peu de recherches sont consacrées à son excrétion par des moisissures comme *Aspergillus* dans les milieux de fermentation [4].

L'objectif de ce travail consiste dans un premier temps, à isoler des mycètes susceptibles de contaminer l'aliment de bétail composé, et dans un second temps sélectionner des isolats producteurs de catalase extracellulaire et ne possédant pas d'activité antibactérienne (test préliminaire de toxicité).

MATERIEL ET METHODES

Echantillon

Notre travail porte sur les aliments de bétail VLB15 et VLB12 destinés aux vaches laitières, et produits dans les unités ONAB de l'Est algérien. Il s'agit des unités de *AIN M'LILA*, *d'EL HARROUCHE*, *d'EL KHROUB* et de *GUELMA* pour VLB15 et *d'EL HARROUCHE* pour VLB12.

L'isolement des mycètes est réalisé selon la méthode de l'AOAC [5] qui consiste à effectuer trois lavages successifs à l'eau distillée stérile de l'échantillon. Après séchage, les échantillons sont ensemencés sur le milieu Czapeck-Dox Agar composé de (g/L): 2.0 Na NO₃, 1.0 KH₂PO₄, 0.5 MgSO₄.7 H₂O, 0.5 KCl, 0.01 FeSO₄ 7H₂O, 30 Saccharose, 20 Agar. L'incubation dure 6 jours à 28-30 °C [6].

Pour la purification des souches fongiques, nous avons appliqué la méthode des dilutions. Les spores sont séparées (monospores) puis ensemencées dans des boîtes de Pétri contenant de l'eau gélosée (Agar 2%). Après une incubation de 18h à 28° C, une bouture mycélienne (repérée au binoculaire) est repiquée dans une boîte de Pétri contenant du Potato – Agar 2% et du Dextrose 2% (w/v) (PDA) [6]. Les colonies sont ensuite réactivées sur Malt-Extract-Agar (MEA) (Agar 2%, glucose 2%, extrait de malt 2%), le milieu idéal pour l'identification fongique [7].

Pour la conservation des souches, les isolats sont repiqués tous les 8 à 10 mois sur gélose inclinée. Après le repiquage, les cultures sont maintenues pendant 2 à 3 semaines à une température compatible avec leur développement. Elles sont ensuite stockées à 4°C [6].

L'identification présomptive des isolats repose sur deux observations : l'une macroscopique, consiste à déterminer la couleur de la colonie pendant son développement et à en mesurer son diamètre ; l'autre microscopique, détecte la présence du thalle, la présence ou l'absence de septum, et les caractéristiques des fructifications et des spores [6,7]. Le mycélium est fixé par une solution contenant: 13 ml de formaldéhyde à 40 % et 5 ml d'acide acétique glacial, ajoutée à 200 ml d'éthanol à 50 % (w/v). La préparation est colorée avec du lactophénol bleu coton [8].

La méthode biochimique consiste à rechercher une substance caractéristique (glucosamine) qui tranche en faveur d'une espèce [7]. La confirmation des résultats a été obtenue par comparaison à des souches de référence

fournies par le laboratoire de mycologie appliquée de l'université de Clermand-Ferrand II (France).

Recherche de substances anti-bactériennes

La toxicité des isolats identifiés est mesurée par l'activité antibactérienne, sur le développement des bactéries test : *Escherichia coli* G (-) et *Bacillus subtilis* G (+). Un écouvillon stérile trempé dans la suspension bactérienne standardisée a servi à ensemencer uniformément toute la surface de la boîte de gélose nutritive. Après séchage de la surface (environ 5 min.), les disques de 5 mm de colonies mycéliennes réactivées sur PDA sont déposés. Après séchage, les boîtes de Pétri sont incubées à 35° C pendant 18 h. Le diamètre des zones d'inhibition est mesuré [24] au millimètre près [1].

Sélection des souches productrices de la catalase extracellulaire

La sélection est réalisée selon la méthode de diffusion dans un milieu gélosé [8] avec quelques modifications. La méthodologie consiste en la détection de zone de diffusion de la catalase sécrétée par les isolats ensemencés sur milieu de sélection composé en g/L de : 0.034 H₂O₂, 20 amidon, 1.0 acide citrique, 0.5 MgSO₄, 0.5 NaNO₃, 2.0 KH₂PO₄ et 0.2 désoxycholate de sodium dans un tampon phosphate 0.1M à pH 7.0. Pour révéler les zones de diffusion, les boîtes sont traitées par 0.2 M KI (pH 2.0) qui donne une couleur bleue à toute la boîte sauf pour les zones de diffusion de la catalase qui apparaissent transparentes.

RESULTATS ET DISCUSSION

Isolement et identification des isolats

Tous les échantillons étudiés ont permis l'isolement de plusieurs groupes de moisissures. Les 4 échantillons d'aliment de bétail (VLB15) et 1 échantillon (VLB12) produits par les unités ONAB de l'Est algérien, ont fournis 166 isolats représentant 13 genres : *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Cordana*, *Cunninghamella*, *Fusarium*, *Gliocladium*, *Mucor*, *Mycotypha*, *Penicillium*, *Pythium*, *Rhizoctonia* et *Rhopalomyces*.

L'échantillon d'aliment de bétail prélevé de l'unité ONAB de *AIN M'LILA* a permis la sélection de 28 isolats appartenant à 7 genres : *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cordana*, *Cunninghamella*, *Penicillium*, *Pythium* et *Rhopalomyces* (Tab. 1). Le genre majoritaire est *Aspergillus* (avec une fréquence de 71.4 %, regroupant 6 espèces) avec *Aspergillus clavatus* (21.4 %) et *Aspergillus niger* (10.7 %).

De l'échantillon d'*EL HARROUCHE* VLB15, nous avons obtenus 24 isolats regroupant 7 genres : *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cunninghamella*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Pythium* et *Rhopalomyces*. Les *Aspergillus* représentent 50 % des isolats avec 4 espèces. Les espèces majoritaires sont les *Aspergillus ochraceus* (25.0 %) et *A. fumigatus* (12.5 %). Les *Penicillium* viennent en seconde position avec 16.0 % de l'ensemble des isolats représentés par 3 espèces (Tab. 1).

A partir de l'échantillon VLB12 prélevé d'*EL HARROUCHE*, 34 isolats ont été identifiées regroupant 2 genres : *Aspergillus* et *Mucor*. L'*Aspergillus flavus* est

Tableau 1: Fréquence (%) des moisissures isolées des échantillons d'aliments de bétail de différentes origines.

Les souches fongiques	L'origine de l'échantillon				
	VLB15 Ain M'lila	VLB15 El Harrouch	VLB12 El Harrouch	VLB15 Guelma	VLB15 El Khroub
<i>Alternaria alternata</i>	3.57	8.33	----*	2.63	4.76
<i>Aspergillus clavatus</i>	21.42	----	----	7.89	4.76
<i>Aspergillus flavus</i>	7.14	8.33	38.23	13.15	14.28
<i>Aspergillus fumigatus</i>	14.28	12.50	----	26.13	14.28
<i>Aspergillus niger</i>	10.71	----	8.82	5.26	2.38
<i>Aspergillus ochraceus</i>	14.28	25.0	2.94	34.21	23.80
<i>Aspergillus oryzae</i>	----	----	20.58	----	----
<i>Aspergillus penicilloid</i>	----	----	8.82	----	----
<i>Aspergillus rimosus</i>	3.57	4.16	----	----	2.38
<i>Aspergillus sp.1</i>	----	----	2.94	----	----
<i>Aspergillus sp.2</i>	----	----	2.94	----	----
<i>Aspergillus terreus</i>	----	----	8.82	----	----
<i>Aspergillus versicolor</i>	----	----	2.94	----	----
<i>Cladosporium sp.</i>	----	----	----	----	2.38
<i>Cordana sp.</i>	3.57	----	----	----	----
<i>Cunninghamella sp.</i>	7.14	8.33	----	2.63	2.38
<i>Fusarium tricinctum</i>	----	4.16	----	----	----
<i>Gliocladium sp.</i>	----	----	----	----	2.38
<i>Mucor plumbeus</i>	----	----	2.94	----	----
<i>Mycotypha sp.</i>	----	----	----	2.63	----
<i>Penicillium chrysogenum</i>	----	4.16	----	----	2.38
<i>Penicillium cyclopium</i>	----	----	----	----	2.38
<i>Penicillium oxalicum</i>	----	----	----	----	4.76
<i>Penicillium purpurescens</i>	3.57	4.16	----	----	2.38
<i>Penicillium viridicatum</i>	3.57	8.33	----	2.63	9.52
<i>Pythium sp.</i>	3.57	4.16	----	----	----
<i>Rhizoctonia solani</i>	----	----	----	----	4.76
<i>Rhopalomyces sp.</i>	3.57	8.33	----	2.63	----

(----) Absence d'isolats.

Tableau 2: Activité antibactérienne et activité enzymatique de catalase extracellulaire des moisissures isolées de l'échantillon d'aliment de bétail VLB15 (Ain M'lila).

N° des souches	Souches fongiques	Moyenne des diamètres de la zone d'inhibition (mm)		R*
		<i>E. coli</i>	<i>B. subtilis</i>	
1	<i>Alternaria alternata</i>	6.0 ⁺	7.0	1.0
2	<i>Aspergillus clavatus</i> (1)	8.0	15.0	1.0
3 (2)	9.0	12.0	1.0
4 (3)	10.0	9.0	1.0
5 (4)	1.0
6 (5)	7.0	6.5	1.0
7 (6)	8.0	7.0	1.0
8	<i>A. flavus</i> (1)	18.0	21.0	1.0
9 (2)	17.0	9.0	1.0
10	<i>A. fumigatus</i> (1)	13.0	9.0	1.0
11 (2)	13.0	10.0	1.0
12 (3)	11.0	7.0	1.0
13 (4)	8.0	7.0	1.0
14	<i>A. phoenicis</i> (1)	6.0	6.0	1.3
15	<i>A. niger</i> (1)	1.2
16 (2)	6.0	7.0	1.1
17	<i>A. ochraceus</i> (1)	14.0	20.0	1.0
18 (2)	13.5	12.0	1.0
19 (3)	19.0	7.0	1.0
20 (4)	1.0
21	<i>A. rimosus</i>	14.0	6.0	1.0
22	<i>Cordana sp.</i>	9.0	6.5	1.0
23	<i>Cunninghamella sp.</i> (1)	7.0	7.0	1.0
24 (2)	6.0	8.0	1.0
25	<i>Penicillium purpurescens</i>	6.0	7.0	1.0
26	<i>P. viridicatum</i>	13.0	13.0	1.0
27	<i>Pythium sp.</i>	1.0
28	<i>Rhopalomyces sp.</i>	8.5	6.0	1.0

* R= diamètre de la zone de diffusion de l'enzyme/ diamètre de la colonie (activité catalasique) + Résultat non significatif = absence d'effet.

Tableau 3: Activité antibactérienne et activité enzymatique de catalase extracellulaire des mycètes isolés de l'échantillon d'aliment de bétail VLB15 (El Harrouch).

N° des souches	Souches fongiques	Moyenne des diamètres de la zone d'inhibition (mm)		R.
		<i>E. coli</i>	<i>B. subtilis</i>	
29	<i>Alternaria alternata</i> (1)	11.5	6.0	1.0
30 (2)	12.0	6.5	1.0
31	<i>Aspergillus flavus</i> (1)	20.5	14.0	1.0
32 (2)	17.5	8.5	1.0
33	<i>A. fumigatus</i> (1)	12.5	8.0	1.0
34 (2)	13.0	10.0	1.0
35 (3)	11.0	14.0	1.0
36	<i>A. ochraceus</i> (1)	19.0	13.0	1.0
37 (2)	13.5	12.0	1.0
38 (3)	18.5	9.0	1.0
39 (4)	1.0
40 (5)	6.0	8.0	1.0
41 (6)	1.0
42	<i>A. rimosus</i>	18.0	6.0	1.1
43	<i>Cunninghamella sp.</i> (1)	1.0
44 (2)	7.0	6.0	1.0
45	<i>Fusarium tricinctum</i>	1.1
46	<i>Penicillium chrysogenum</i>	14.0	13.0	1.0
47	<i>P. purpurescens</i>	6.0	7.0	1.0
48	<i>P. viridicatum</i> (1)	12.0	13.0	1.0
49 (2)	13.0	14.0	1.0
50	<i>Pythium sp.</i>	1.0
51	<i>Rhopalomyces sp.</i> (1)	8.25	6.0	1.0
52 (2)	10.0	9.0	1.0

Tableau 4: Activité antibactérienne et activité enzymatique de catalase extracellulaire des mycètes isolés de l'échantillon d'aliment de bétail VLB12 (El Harrouch).

N° des souches	Souches fongiques	Moyenne des diamètres de la zone d'inhibition (mm)		R.
		<i>E. coli</i>	<i>B. subtilis</i>	
53	<i>Aspergillus flavus</i> (1)	8.0	7.0	1.0
54 (2)	1.0
55 (3)	1.0
56 (4)	1.0
57 (5)	1.0
58 (6)	1.0
59 (7)	1.0
60 (8)	1.0
61 (9)	11.0	7.5	1.0
62 (10)	8.0	1.0
63 (11)	1.0
64 (12)	1.0
65 (13)	13.0	6.0	1.0
66	<i>A. niger</i> (1)	1.3
67 (2)	7.0	1.2
68 (3)	1.3
69	<i>A. ochraceus</i>	12.0	9.0	1.0
70	<i>A. oryzae</i> (1)	8.0	12.5	1.0
71 (2)	7.0	8.0	1.0
72 (3)	1.0
73 (4)	1.0
74 (5)	6.0	9.0	1.1
75 (6)	7.0	1.0
76 (7)	7.0	10.5	1.0
77	<i>A. penicilloïd</i> (1)	8.0	1.0
78 (2)	1.0
79 (3)	6.0	8.0	1.0
80	<i>Aspergillus sp.</i> (1)	6.0	17.0	1.0
81 (2)	6.0	9.0	1.0
82	<i>A. terreus</i> (1)	9.0	15.5	1.0
83 (2)	1.0
84 (3)	1.0
85	<i>A. versicolor</i>	18.0	6.0	1.0
86	<i>Mucor plumbeus</i>	8.5	9.0	1.0

Tableau 5: Activité antibactérienne et activité enzymatique de catalase extracellulaire des mycètes isolés de l'échantillon d'aliment de bétail VLB15 (Guelma).

N° des souches	Souches fongiques	Moyenne des diamètres de la zone d'inhibition (mm)		R
		<i>E. coli</i>	<i>B. subtilis</i>	
87	<i>Alternaria alternata</i>	6.5	7.0	1.0
88	<i>Aspergillus clavatus</i> (1)	6.0	19.5	1.0
89 (2)	6.5	12.0	1.0
90 (3)	10.0	9.0	1.0
91	<i>A. flavus</i> (1)	19.0	20.0	1.0
92 (2)	17.0	9.0	1.0
93 (3)	10.0	6.0	1.0
94 (4)	6.0	7.0	1.0
95 (5)	10.0	12.0	1.0
96	<i>A. fumigatus</i> (1)	19.0	8.0	1.0
97 (2)	10.0	7.0	1.0
98 (3)	12.5	7.0	1.0
99 (4)	6.5	6.5	1.0
100 (5)	19.0	12.0	1.0
101 (6)	1.0
102 (7)	6.7	7.0	1.0
103 (8)	9.0	11.0	1.0
104 (9)	10.0	9.0	1.0
105 (10)	7.5	6.0	1.0
106	<i>A. niger</i> (1)	7.0	6.0	1.3
107 (2)	7.0	6.0	1.2
108	<i>A. ochraceus</i> (1)	14.0	14.0	1.0
109 (2)	14.0	12.0	1.0
110 (3)	19.0	9.0	1.0
111 (4)	1.0
112 (5)	6.0	8.0	1.0
113 (6)	1.0
114 (7)	9.5	7.5	1.0
115 (8)	9.5	7.0	1.0
116 (9)	10.0	6.0	1.0
117 (10)	8.7	7.0	1.0
118 (11)	1.0
119 (12)	9.0	8.0	1.0
120 (13)	8.0	8.0	1.0
121	<i>Cunninghamella sp.</i>	6.0	7.0	1.0
122	<i>Mycotypha sp.</i>	7.0	6.0	1.0
123	<i>Penicillium viridicatum</i>	14.0	15.0	1.0
124	<i>Rhopalomyces sp.</i>	6.0	6.0	1.0

l'espèce majoritaire avec 38.2 % suivi par *A. oryzae* (20.0 %) (Tab. 1).

L'isolement et l'identification des Mycètes de l'échantillon d'EL KHROUB, ont abouti à 42 isolats regroupant 7 genres : *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Cunninghamella*, *Gliocladium*, *Penicillium* et *Rhizoctonia*. Comme précédemment, le genre *Aspergillus* est dominant avec 61.9 % regroupant 6 espèces et le genre *Penicillium* représente 13.6 % avec 5 espèces (Tab. 1).

De l'échantillon d'aliment de bétail prélevé de GUELMA, nous avons pu isoler et identifier 38 isolats appartenant aux genres : *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cunninghamella*, *Mycotypha*, *Penicillium* et *Rhopalomyces*. Le genre *Aspergillus* est toujours dominant avec 86.8 % regroupant 5 espèces (Tab. 1).

Au terme de cet isolement, 13 genres ont été répertoriés : *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Cordana*, *Cunninghamella*, *Fusarium*, *Gliocladium*, *Mucor*, *Mycotypha*, *Penicillium*, *Pythium*, *Rhizoctonia* et *Rhopalomyces*.

Nous constatons que cette mycoflore comprend un grand nombre d'espèces se développant au champ [6] et dans la mouture au cours du stockage. Dans un aliment à

base de céréales, il a été dénombré par gramme jusqu'à 6.5 X10³ spores d'*Aspergillus* et un nombre avoisinant de *Penicillium* [9,10]. Ces deux genres sont dominant. La présence des espèces appartenant aux *Ascomycetes* et aux *Deuteromycetes* peut être expliquée par leur tolérance aux températures élevées d'une part et par leur développement à faible hygrométrie d'autre part [11].

Recherche de substances anti-bactériennes

Actuellement, on dénombre 10700 antibiotiques répertoriés dont 1600 sont d'origine fongique [6]. Les mycotoxines peuvent avoir également un effet antibactérien [11]. Aussi, nous avons évalué l'effet inhibiteur (toxicité) de quelques souches de moisissures sur les bactéries test (Tab. 1 à 6).

L'effet antibactérien est détecté par le diamètre du halo autour du disque imprégné de moisissures. Les différentes souches peuvent être divisées en 3 groupes en fonction du diamètre de la zone d'inhibition :

- Des souches à fort effet : le diamètre de la zone d'inhibition (sur *E coli* et sur *B. subtilis*) est égal ou supérieur à 13 mm: il

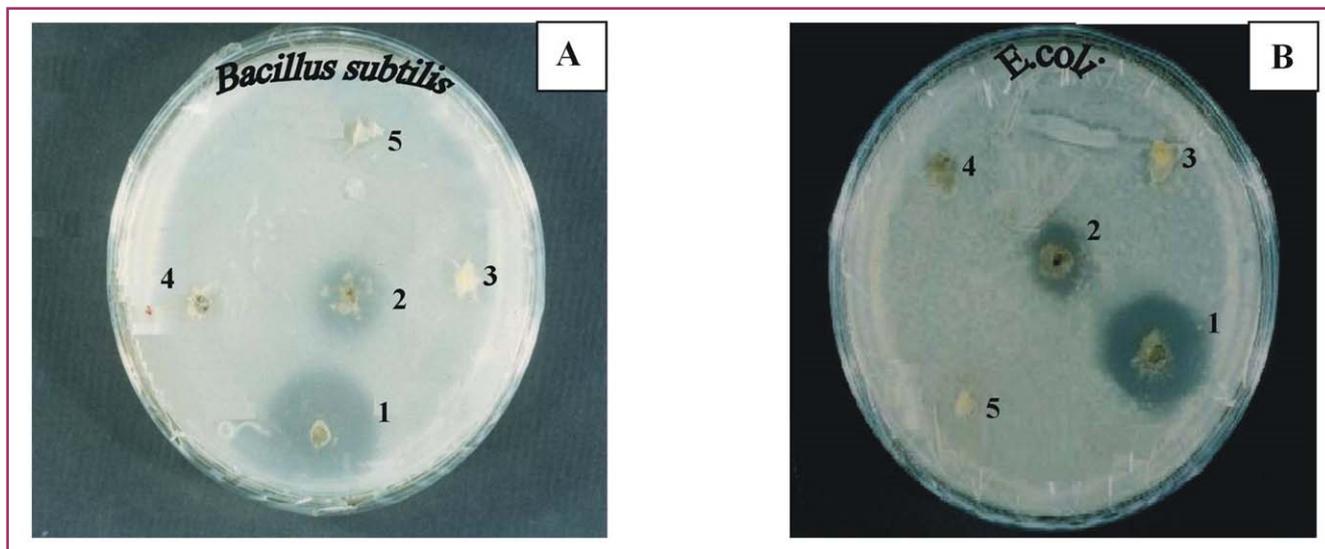


Figure 1: Effet antibactérien des souches fongiques ; 1 *A. flavus* (31), 2 *P. viridicatum* (48), 3 *Rhopalomyces sp.* (124), 4 *A. phoenicisr* (14), 5 *Alternaria alternata* (1) sur ; **A** *Bacillus subtilis*, **B** *E. coli*.

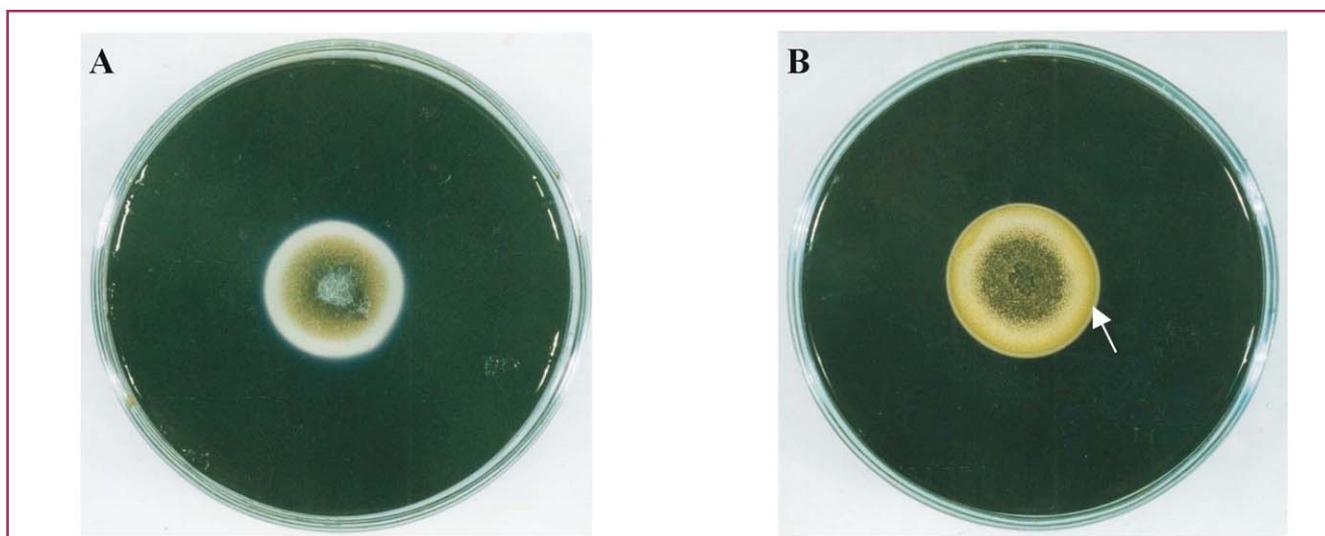


Figure 2: Détection de la catalase extracellulaire : **A** absence de sécrétion par *A. flavus* (31), **B** présence de sécrétion (—▶) par *A. phoenicis* (14).

s'agit d' *A. flavus* (8, 31, 91, 128) ; *A. fumigatus* (134) ; *A. ochraceus* (17, 36, 108, 141, 143) ; *Penicillium chrysogenum* (46) ; *P. cyclopium* (157) ; *P. viridicatum* (26, 49, 122, 161, 162).

- Des souches à effet moyen: le diamètre de la zone d'inhibition de l'une des bactéries est égal ou supérieur à 13mm. : *A. rimosus*, *A. terreus* ; *A. versicolor* et *A. clavatus*.

- Des souches de faible effet: le diamètre de la zone d'inhibition des deux bactéries est inférieur à 13 mm : *A. niger*; *Alternaria alternata*; *Cordana sp*; *Cunninghamella sp*.

Ces souches sont connues pour leur production d'antibiotiques et de mycotoxines à effet antibactérien [6]. Ces métabolites secondaires (sont des substances biologiquement actives, synthétisées par les moisissures en fin de croissance [24]. Par ailleurs, il est connu que les genres *Aspergillus* et *Penicillium* constituent le réservoir principal de ces substances [6].

Sélection des souches produisant une catalase extracellulaire

La majorité des isolats ne sécrètent pas de catalase dans le milieu de culture, cependant, les souches *A. niger* ont montré la capacité d'excréter cette enzyme (en faible quantité) (Tableaux 2, 3, 4, 5, 6). La figure 2 montre une colonie d'*A. niger* (14) isolée de l'aliment de bétail VLB15 d' Ain M'lila avec une couronne transparente et fine autour de la colonie(diamètre de la couronne/diamètre de la colonie est de 1.3). La littérature consultée fait part de la production de la catalase par *Aspergillus niger* et par d'autres microorganismes, mais comme enzyme intracellulaire [15-17]. Cependant, peu de travaux ont abordé la production de la catalase extracellulaire par des mutants d'*A. niger* [18] ou par les mycètes filamenteux [19]. L'aspect extracellulaire des enzymes a été attribué,

pour la première fois, à l'autolyse cellulaire [20]. Récemment, l'analyse du gène de la glucose oxydase (GOD) de *A. niger* a révélé la présence d'un peptide de signal confirmant l'observation que la GOD est activement sécrétée dans le milieu de culture [21-23]. Il a été établi que la GOD est une enzyme qui accompagne la catalase dans les systèmes biologiques [23]. Les résultats de cette étude, montrent que certaines souches d'*A. niger* ont la particularité de sécréter une catalase extracellulaire et ne libèrent pas de substances antibactériennes.

CONCLUSION

L'aliment de bétail analysé est fortement contaminé par la flore fongique. Cette flore appartenant en majorité, aux Ascomycètes et aux Deuteromycètes, contaminants naturels des céréales qui composent cette denrée. Les genres dominants sont *Aspergillus* et *Penicillium*. Parmi les genres isolés (*Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Cordana*, *Cunninghamella*, *Fusarium*, *Gliocladium*, *Mucor*, *Mycotypha*, *Penicillium*, *Pythium*, *Rhizoctonia* et *Rhopalomyces*), seules les souches d'*Aspergillus niger* ont montré une capacité de sécrétion de la catalase extracellulaire. Cette production n'est pas corrélée à l'excrétion de substances antibactériennes ; ces souches sont présumées être non toxiques.

REFERENCES

- [1]- Prescott H.K., "Microbiology", (ed.) De Boeck-Wesmael S.A., Bruxelles (1995).
- [2]- Lafonte P. and Lafonte J., "Production d'Aflatoxines par des souches d'*Aspergillus flavus* de différentes origines". *Mycopathol. Mycol. Appl.*, Vol. 43 (1971), pp. 323-328.
- [3]- Holaday C.E., "A rapid screening method for the aflatoxins and ochratoxin A", *J.A.O.C.S.*, Vol. 53 (1976), pp.603-605.
- [4]- Fiedurek J. and Gromada, A., "Screening and mutagenesis of moulds for improvement of the simultaneous production of catalase and glucose oxidase", *Enzyme Microb. Technol.*, Vol. 19 (1996), pp. 122-130.
- [5]- A.O.A.C., "Association of Official Agricultural Chemists", Ed. Arlington, Vol.138 (1984), pp. 132-136.
- [6]- Botton B., Breton A., Fevre M., Gauthier S., Guy Ph., Larpent J-P., Reymond P., Sanglier J-J., Vayssier Y. and Veau P., "Moisissures utiles et nuisibles, importance industrielle", (ed) Masson, Paris (1990).
- [7]- Samson A.R., Hoekstra E.S. and Van Oorschot CAN., "Introduction to food-borne fungi", (ed.) C.B.S, Amsterdam (1981).
- [8]- Packer H.L. and Thomas C.R., Microbiological measurements on filamentous microorganisms by fully automatic image analysis. *Biotechnol. Bioeng.*, Vol.35 (1990), pp. 870-881.
- [9]- Scott PM., van Walbeek W., Kennedy B. and Anyeti D., "Mycotoxins (Ochratoxin A, Citrinin, sterigmatocystin) and toxigenic fungi in grains and other agricultural products", *J. Agric. Food chem.*, Vol. 20 (1972), pp. 1103-1109.
- [10]- Christensen C. and Kaufman H., *American Assoc. of Cereal Chemists*, Vol.12 (1974), pp.158-192.
- [11]- Lafonte P. et Lafonte J., "Contamination de produits céréaliers et d'aliment de bétail par Aflatoxines"; *Fd. Cosmet. Toxicol.* Vol. 8 (1970), pp. 403-408.
- [12]- Caridis, K.A., Christakopoulos, P. and Macris, B.J., "Simultaneous production of glucose oxidase and catalase by *Alternaria alternata*", *Appl. Microb. Biotechnol.*, Vol. 34 (1991), pp. 794-797.
- [13]- Gromada, A. and Fiedurek, J., "Selective isolation of *Aspergillus niger* mutants with enhanced glucose oxidase production", *J. Applied Microbiology*, Vol. 82 (1997), pp. 648-652.
- [14]- Gregory E.M. and Fridovich I., "Visualisation of catalase on acrylamide gels", *Analytical Biochemistry*, Vol. 58 (1974), pp. 57-62.
- [15]- Rogalski J., Fiedurek J. and Gromada A., "Purification of extracellular catalase from *Aspergillus niger*", *Acta Microbiologica Polonica*, Vol. 47, N° 1 (1998), pp. 31- 43.
- [16]- Fiedurek J. and Gromada, A., "Selection of biochemical mutants of *Aspergillus niger* with enhanced catalase production", *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, Vol. 47 (1997), pp. 313-316.
- [17]- Nykanen M., Saarelainen R., Raudaskoski M., Nevalainen K.M.H. and Mikkonen A., "Expression and secretion of barley cysteine and peptidase β and cellobiohydrolase I in *Trichoderma reesei*", *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 63 (1997), pp. 4929-4937.
- [18]- Nishikawa Y., Kawata Y., and Nagai J., "Effect of triton X-100 on catalase production by *Aspergillus terreus* IF06123", *J. Ferment. Bioeng.*, Vol. 76 (1993), pp.235-236.
- [19]- van Dijken J.P. and Veenhuis M., "Cytochemical location of glucose oxidase in peroxisomes of *Aspergillus niger*", *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, Vol. 9 (1990), pp.275-283.
- [20]- Mischak H., Kubicek CP. and Röher M., "Formation and localization of glucose oxidase in citric acid producing mycelia of *Aspergillus niger*", *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, Vol. 21 (1985), pp.27-31.
- [21]- Frederik KR., Tung J., Emerick RS., Maziare FS., Chamberlain SH., Vasvada A., Rosenberg S., Chakraborty S., Schopfer LM. and Massey V., "Glucose oxidase from *Aspergillus niger*: cloning, gene sequence, secretion from *Saccharomyces cerevisiae* and kinetic analysis of a yeast-derived enzyme", *J. Biol. Chem.*, Vol. 265, (1990), pp. 3793-3802.
- [22]- Pluschkell S., Hellmuth K. and Rinas U., "Kinetics of Glucose oxidase Excretion by recombinant *Aspergillus niger*", *Biotechnol. Bioengineering*, Vol. 51, N° 2, (1996), pp.215-220.
- [23]- El-Enshasy H., Hellmuth K. and Rinas U., "Gpda-Promoter-Controlled Production of glucose oxidase by recombinant *Aspergillus niger* using nonglucose carbon sources", *Appl. Biochem. Biotechnol.*, Vol. 90 (2001), pp. 57- 66.
- [24]- Attala M. and Kacem-Chaouche N., "Production of Ochratoxin A in a semi-synthetic medium", In "The second regional Mycological Conf. RMC 2", Cairo, Egypt (1992). □