

Distribution écologique des champignons filamenteux thermophiles isolés à partir des principales

Maâsra du Maroc

Khadija LAMRANI ¹, Mustapha ISMAILI-ALAOUI ¹, Mostafa CHEHEB ¹,
Nizar KAMMAS ¹, Lotfi IRAQI HOUSSAINI ¹, Hicham HASSOUNI ¹,
Bernard RIO ², Moussa ETTALIBI ³ & Sevastianos ROUSSOS ²

¹ Laboratoire des Bioconversions, Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II, BP. 6202-Instituts, Madinate Al Irfane, 10101 Rabat, Maroc

² IRD, Biotrans R-185, IMEP, Boite 441; FST Saint Jérôme, Université Paul Cézanne, F-13397, Marseille cedex 20, France

³ Département de Biochimie, Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II, BP. 6202-Instituts, Madinate Al Irfane, 10101 Rabat, Maroc

Auteure, correspondante: lamranikhadija@hotmail.com

1. INTRODUCTION

Les champignons représentent un ensemble très hétérogène. Les individus occupent toutes sortes d'habitats. L'intérêt économique des champignons filamenteux repose sur leur capacité à produire une grande diversité de molécules. Cette caractéristique a pour conséquence une grande diversité biochimique (Boiron, 1996). Les recherches sur les champignons filamenteux thermophiles (CFT) ont déjà acquis un grand intérêt, principalement pour la production d'enzymes thermostables utilisés dans des procédés industriels (Maheshwari *et al.*, 2000). Les CFT sont caractérisés par des vitesses de croissance élevées. Ceci suppose que la biosynthèse des produits issus de leur métabolisme serait particulièrement rapide (Cordova, 1998; Cordova *et al.*, 2003).

Le Maroc offre des biotopes très différenciés (désert, mer, montagnes, ...), ce qui le rend très riche en biodiversité où la sélection s'est faite le plus naturellement possible. L'olivier constitue, au Maroc, la principale essence fruitière tant par le nombre d'arbres existants que par l'importance sociale de sa culture. Il est présent dans des aires écologiques très différentes.

La production d'olives est destinée à la transformation en huile. Le reste est réservé à la consommation directe sous forme d'olives de table. La trituration des olives a lieu dans des moulins traditionnels appelés Maâsra (Loussert, 1986).

Le nombre des Maâsra (Photo 1 et Photo 2) est estimé à 16 000 unités (MAMVA, 1997) concentrées dans deux régions principales: la zone des plateaux (Fès, Meknès et Taza) et la zone des plaines intérieures avec principalement les régions de Tadla et du Haouz de Marrakech.



Photo 1. Maâsra traditionnelle



Photo 2. Maâsra améliorée

En général, la culture des champignons est effectuée sur milieu solide (Carlile & Watkinson, 1996), ce qui correspond à leur habitat naturel de croissance (il y a très peu de champignons dans l'eau; par contre, les moisissures colonisent naturellement tous les substrats solides humidifiés) (Roussos, 1985). Les champignons filamenteux sont des eucaryotes présentant une structure mycélienne à organisation cœnocyttique (Alexopoulos *et al.*, 1996; Dix & Webster, 1995). Les CFT présentent des températures limites de croissance situées entre 20°C et plus 50°C. Quant aux champignons filamenteux thermotolérants, des températures inférieures à 20°C peuvent être tolérées (Cooney & Emerson, 1964; Crisan, 1973).

Pour mieux étudier la mycoflore des Maâsra du Maroc, on s'est fixé trois axes:

- La biodiversité des champignons filamenteux thermophiles (CFT) des Maâsras et d'autres biotopes afin de constituer une collection importante IAV-IRD.
- L'isolement, la purification, la description et l'identification de nouvelles souches de champignons filamenteux thermophiles et thermotolérants.
- L'étude des mécanismes physiologiques, biochimiques des souches sélectionnées en décrivant les besoins nutritionnels et les potentialités métaboliques de ces micro-organismes en vue de sélectionner des souches capables de produire des enzymes thermostables par fermentation en milieu solide et ce, en utilisant des grignons d'olives et/ou d'autres sous-produits de l'industrie agricole.

2. MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1. Échantillonnage

Le prélèvement d'échantillons de différentes natures (sol, olives, grignons d'olives, brindilles, feuilles, ...) a été réalisé à partir des différentes Maâsra du Maroc. L'échantillonnage a été effectué dans différentes régions oléicoles et pendant trois campagnes oléicoles successives: 1999-2000; 2000-2001 et 2001-2002.

2.2. Collection des champignons filamenteux thermophiles et thermotolérants

Au cours de ce travail, environ 400 souches de champignons filamenteux thermophiles et thermotolérants ont été isolées à partir des Maâsra appartenant à différentes régions du Maroc. En outre, 12 souches de référence ont été utilisées, 6 souches provenant de

la collection internationale du CBS (CentraalBureau voorSchimmelcultures) et 6 souches de la collection du MNHN(Muséum National d'histoire Naturelle).

2.3. Milieux de culture et conditions d'incubation

Plusieurs milieux de culture ont été utilisés comme le montre le tableau 1. Le pH est ajusté à 5.6. La stérilisation est effectuée à 120°C pendant 20 min

Tableau 1. Composition des différents milieux de culture utilisés et conditions d'incubation des champignons filamenteux thermophiles et thermotolérants

Milieux de culture	Composition (g/l)	Incubation
Isolement	Grignons d'olive: 40, agar: 15, chloranphénicol:0,25 PDA, autres+chloranphénicol	50°C; 3 à 7 j
Identification	MEA (Malt Extract Agar) PDA(Potato Dextrose Agar)	30°C, 37°C & 45°C ; 7 j
Sporulation	PDA	30°C, 7 j
Thermophilie	Peptone,10; NaCl,5; CaCl ₂ ,0.1; agar, 20; tween 80, 10 ml PDA	(19°C, 25°C, 35°C,45°C, 55°C, 60°C) 3 à 10 j
Détection des estérases	Milieu thermophilie	35°C, 45°C, 3 à 7 j
Détection des phytases	L'acide phytique:10;KH ₂ PO ₄ :0,247 ; (NH ₄) ₂ SO ₄ : 6,6 ;CaCl ₂ :0,48 ;MgSO ₄ : 0.38;NaCl: 0,32 ; Agar: 20	35°C, 45°C, 3 à 7 j
Détection des tannases	L'acide tannique:4; KH ₂ PO ₄ :2,47; le reste idem	35°C, 45°C, 3 à 7 j

2.4. Isolement et entretien des souches

Pour l'isolement des souches thermophiles et thermotolérantes, la température d'incubation utilisée a été fixée à 50°C. Pour les différents milieux d'isolement, un antibiotique (chloramphénicol: 0,25 g/l) a été ajouté pour inhiber toute prolifération bactérienne.

Après isolement, plusieurs repiquages des souches sur milieu PDA (Potato Dextrose Agar) sont nécessaires avant d'obtenir une souche pure. Le choix des espèces à prélever est fait à l'œil nu, en tenant compte de la ressemblance des thalles.

Une fois que la souche est obtenue à l'état pur, elle est conservée de trois manières:

- dans des piluliers contenant du PDA;
- dans des petits piluliers contenant du sable sec et stérilisé à sec;
- sous azote liquide à -196°C.

2.5. Identification

L'étude des caractères cultureux et morphologiques des souches isolées a été réalisée en utilisant différentes clés d'identification et en les comparant à des souches de référence (Roquebert,1997).

2.5.1. Clés d'identification

Ont été utilisées:

- La clé de Raper & Fennel (1965,1977) pour l'identification des *Aspergillii*.
- La clé de Pitt (1979, 1998) pour l'identification des *Penicillii*.
- La clé de Cooney&Emerson (1964) pour l'identification des champignons filamenteux thermophiles (CFT).
- La clé de Schipper (1978) et de Schipper & Stalpers (1984) pour l'identification des *Mucor* et des *Rhizopus*.

2.5.2. Caractérisation des souches thermophiles

Pour ce faire, le milieu Hankin & Anagnostakis(1975) et le milieu Potato Dextrose Agar (39 g/l) ont été utilisés à différentes températures (19°C, 25°C, 35°C, 45°C, 55°C et 60°C). La croissance apicale a été déterminée par la vitesse de colonisation d'une surface solide suivant la relation:

$$Va \text{ moy} = \frac{D_{\max}/2}{\text{Temps}}$$

Va moy étant la vitesse de croissance apicale moyenne en mm/ heure et Dmax le diamètre en mm du dernier jour

2.5.3. Effet de la source de carbone

Le glucose, la caséine, l'amidon, la carboxyméthylcellulose (CMC), le saccharose, le tween 80, l'acide phytique et l'acide tannique ont été utilisés séparément comme unique source de carbone. La température d'incubation a été fixée à 50°C.

2.5.4. Détection sur milieu solide des activités enzymatiques

L'estérase et la tannase sont mises en évidence par la présence d'un halo clair, visible sur un fond noir. Cela correspond à la zone d'hydrolyse du substrat approprié. Pour les autres enzymes, elles sont mises en évidence par la croissance du champignon sur le milieu contenant le substrat correspondant.

2.6. Comptage des spores

Deux à trois gouttes d'une suspension de spores ont été inoculées dans des erlenmeyers de 250 ml contenant 50 ml de PDA en surfusion, puis incubés à 45°C pendant 5 à 7 jours. Les spores sont récupérées à la surface du milieu gélosé à l'aide d'un agitateur électromagnétique pendant environ 30 minutes, dans une solution de tween 80 (0.01%) pour l'obtention de 2.10^7 spores par gramme de substrat sec.

Pour le comptage proprement dit des spores, on utilise la cellule de Malassez sous microscopie optique. Pour cela, on effectue une dilution au $1/100^5$ à l'aide de l'eau tweenée précédente. Le comptage est valable lorsque le nombre de spores est compris entre 10 et 30 par champ de lecture. Les résultats sont exprimés soit en nombre de spores par ml de la suspension initiale, soit en nombre de spores par cm^2 . Pour les calculs on utilise la relation suivante:

$$N = n \cdot 10^5 \cdot F$$

N: nombre de spores par ml suspension initiale

n: nombre moyen de spores dans la cellule de comptage

f: facteur de la dilution (inverse de la dilution)

$$X = (N \cdot V) / S$$

X: nombre de spores par cm^2

N: nombre de spores par ml de la suspension initiale.

V: volume de la solution de tween 80 ajoutée en ml.

S: surface du milieu gélosé en cm^2

3. RÉSULTATS ET DISCUSSION

Ce travail a été focalisé sur l'isolement, l'identification et le dénombrement des champignons filamenteux thermophiles et thermotolérants dans leur habitat naturel.

3.1. Stratégie d'échantillonnage

Les prélèvements ont été méticuleusement opérés à partir des sites bien ciblés. L'opération consistait avant tout d'anticiper sur la réussite d'isolement des champignons filamenteux thermophiles. Aussi, a-t-on raisonné sur le fait que quantitativement la microflore serait importante si les prélèvements réalisés étaient à l'intérieur du tas, là où la vapeur issue des réactions exothermiques du métabolisme est visible. Concernant les 178 échantillons étudiés, ils diffèrent du point de vue nature (sol, grignons d'olive, feuilles, olives,...) et du point de vue origine.

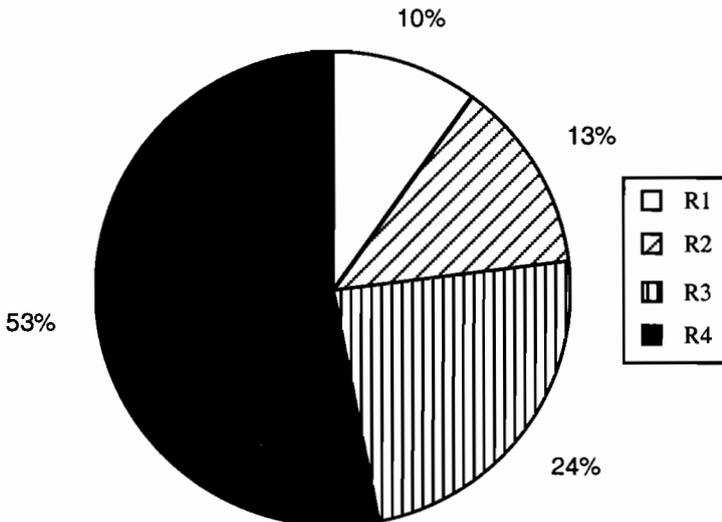


Figure 1. Origine des 178 échantillons prélevés à partir des Maâsra appartenant à différentes régions du Maroc

R1: Ouezzane, Chefchaouène; R2: Méknès, Khémisset; R3: Béni-Mellal, Fkih Bensalah; R4: Taroudant, Rich, Errachidia

3.2. Isolement

Pour l'isolement d'un champignon filamenteux quelconque, la première étape consiste à faire le choix de l'habitat du micro-organisme voulu (ex: CFT). La deuxième étape concerne la technique d'enrichissement. Celle-ci est réalisée en mettant un échantillon dans un milieu de culture sélectif en fixant les conditions d'incubation. L'objectif est d'obtenir un champignon filamenteux spécifique en culture pure (Scriban, 1993).

La stratégie d'isolement, à partir de 178 échantillons provenant de différentes zones du Maroc, a été planifiée comme suit:

- Pour favoriser la croissance des champignons thermophiles, plusieurs milieux d'enrichissement sélectifs ont été utilisés à 50°C (Photo 3).
- Pour purifier les différentes souches obtenues à partir d'un même échantillon, des repiquages successifs ont été réalisés sur un milieu d'enrichissement à base de PDA contenant un antibiotique spécifique, en l'occurrence le chloramphénicol (0,25g/ml).



Photo 3. Mélange d'espèces de CFT cultivées sur différents milieux après incubation à 50°C

Les souches purifiées sont conservées sur milieu d'entretien PDA en piluliers à 4°C. Pour la conservation longue durée, les souches sont enfouies dans du sable et sous azote liquide à -196°C.

3.3. Purification et conservation

Au cours de la purification, le repiquage repose sur le choix des espèces à prélever. Ceci doit tenir compte de la ressemblance des thalles d'après leurs caractères visibles à l'œil nu, à savoir:

- la couleur des spores;
- la couleur des thalles;
- la présence d'un pigment diffusant;
- la présence d'un organe de reproduction sexuelle;
- la présence ou non d'un exsudat;
- la vitesse de croissance apicale;
- l'aspect, le contour et le revers du thalle.

Par ailleurs tout détail quelconque est recherché pour différencier ou rapprocher deux thalles.

3.4. Identification

Cette identification a été réalisée selon différentes clés et en comparaison avec les souches répertoriées. Elle fait appel aux caractères cultureux et morphologiques de la souche à étudier.

Les caractères cultureux concernent la vitesse apicale, la texture, l'épaisseur, la couleur du thalle, la pigmentation de l'agar, la production d'exsudat et les odeurs des colonies.

Les caractères morphologiques comprennent les observations microscopiques suivantes:

- au niveau du mycélium: couleur, dimensions, ornementation des parois, mode de ramification, différenciation des thallospores, absence ou présence de cloisons.
- au niveau des organes différenciés: forme, couleur, dimensions, texture des parois, etc.

Botton *et al.* (1990) estiment le nombre de champignons à 50 000 espèces connues et considèrent qu'il en existe au moins autant à découvrir. Ces micro-organismes, d'une grande variété de formes et de structures, ont fait l'objet de classifications complexes (Tableau 2).

Tableau 2. Principaux groupes de moisissures à importance industrielle (Botton *et al.*, 1990)

Nom du groupe	Principaux caractères
Zygomycètes	Thalle à mycélium siphonné, sans ou à cloisons présentes seulement au niveau des appareils reproducteurs, Spores asexuées formées dans des sporocystes.
Ascomycètes	Thalle à mycélium cloisonné. Reproduction végétative généralement par conidies exogènes ou par fragmentation du mycélium. Spores sexuées formées dans des asques, en nombre défini.
Deuteromycètes	Thalle à mycélium septé. Pas de reproduction sexuée connue (ou reproduction sexuée peu fréquente)

3.4.1. Identification de quelques espèces de champignons filamenteux thermophiles et thermotolérants

Les souches sont ensemencées en duplicata sur MEA (Malt Extract Agar) et incubées, pendant une semaine, à deux températures 30°C et 37°C. Même lorsque les champignons récemment isolés se développent mieux à des températures élevées, les descriptions morphologiques doivent être faites sur des cultures réalisées à 30°C et à 37°C afin de pouvoir exploiter les clés d'identification existantes dans la littérature.

3.4.1.1. Identification du genre *Aspergillus fumigatus*

Ce filamenteux de la classe des Hyphomycètes appartient à la famille des Phialosporae. Il se caractérise par la formation d'organes de reproduction asexués: les kystes aspergillaires. Le conidiophore non septé, de longueur variable, présente un renflement à son extrémité (la tête conidienne).

Parmi les propriétés examinées, on distingue:

- La présence de filaments hyalins cloisonnés, ramifiés, de diamètre constant voire de kystes aspergillaires (rares mais caractéristiques) à l'examen direct.
- La culture avec apparition rapide, en 3 à 5 jours, de thalles d'aspect poudreux.
- Les filaments mycéliens septés, chevelus et vésiculeux.
- Une croissance rapide sur milieu PDA, sans chloramphénicol, ou sur milieu de Czapek.
- La surface de la colonie se colore en vert foncé puis en gris vert foncé.
- Les conidiophores verdâtres mesurent environ 300 µm de long.
- La tête conidienne claviforme (forme de massue) porte directement de nombreuses phialides (tête unisériée) disposées parallèlement à angle droit.
- Les conidies globuleuses à sub-globuleuses.

3.4.1.2. Identification du genre *Humicola*

Pour ce genre appartenant également à la classe des Hyphomycètes, deux espèces thermophiles ont été isolées: *Humicola lanuginosa* et *Humicola grisea*.

Les observations sont comme suit:

- Thalle hyalin puis virant au gris à brun - noir.
- Parfois diffusion d'un pigment.
- Hyphes sont septées et courtes.
- Phialides rares.
- Cellules fertiles courtes, hyalines ne formant qu'une seule spore à leur extrémité noire; ces spores ou conidies solitaires globuleuses à sub-globuleuses, le plus souvent lisses, sont aussi appelées Aleuriospores.

Humicola lanuginosa est caractérisée par des conidies globuleuses, noires, à paroi épaisse et verruqueuse. Pour sa part, *Humicola grisea* présente des conidies plus grosses, 12-17 µm de diamètre.

3.4.1.3. Identification de *Pæcilomyces variotii*

Pæcilomyces variotii appartient à l'ancienne classe des Deuteromycotina, actuellement Hyphomycètes. Les thalles de *P. variotii* sont à croissance habituellement rapide et sont blancs, jaunes, bruns, roses. Les conidiophores isolés ou en verticilles portent directement des phialides à base large, à col long, ou via des branches dont sont issues les conidies.

Parmi les propriétés examinées, on distingue:

- Des filaments mycéliens septès, hyalins de 3 à 5µm dont certains sont plus ou moins déformés dans les tissus.
- Une croissance rapide, un aspect poudreux,
- Une couleur brun pale à brun jaune.
- Un revers jaunâtre à brun foncé.
- Des conidiophores de 30 à 90 µm sur 3 à 7 µm portant 2 à 7 phialides.
- Certaines phialides sont solitaires, le long des hyphes.
- Des ramifications en verticilles plus ou moins irrégulières.

3.4.1.4. Identification du genre *Rhizopus*

Ce champignon appartient à la classe des Zygomycètes, ordre des Mucorales. Il est caractérisé par un mycélium luxuriant, des sporocystophores (sporangiophores) ramifiés vers le haut, formés soit sur des hyphes aériennes, soit sur des stolons avec, dans les deux cas, des rhizoïdes.

Parmi les propriétés examinées, on distingue:

- Des sporocystes multispores, globuleux, noirs, pourvus d'une collumelle, sans apophyse. la vitesse de la croissance apicale est extrêmement rapide surtout sur PDA à 45°C.

Rhizopus miehei, sur PDA, présente un thalle d'abord blanc puis gris. Il est caractérisé par le fait qu'il est homothallic et par des zygospores ne dépassant pas 50 µm.

3.5. Caractérisation physiologique

3.5.1. Recherche des champignons filamenteux thermophiles et thermotolérants

La température est un des facteurs environnementaux influençant la croissance des champignons. Pour le tester, les souches ont été incubées à 6 températures différentes: 19°C, 25°C, 35°C, 45°C, 55°C, 60°C (Tableau 3).

Les résultats montrent que les espèces isolées sont capables de se développer à différentes températures. *Aspergillus fumigatus* est la seule espèce qu'on peut considérer comme thermotolérante, car elle présente une croissance à 19°C. Les autres espèces sont thermophiles. Dans le cas de *Humicola lanuginosa*, *H. grisea*, *Thermoascus aurantiacus*, *Malbranchea sulferea* et *Myceliophthora thermophila*, il y a une croissance à 60°C. Ces CFT ont été fréquemment isolées au niveau des régions du sud (Errachidia, Rich,...)

Tableau 3. Croissance apicale (mm.h⁻¹) des différentes espèces en fonction de la température d'incubation

Espèces	19°C	25°C	35°C	45°C	55°C	60°C
<i>Aspergillus fumigatus</i>	0,17	0,27	0,31	0,40	0	0
<i>Humicola grisea</i>	0	0	0,46	0,47	0,25	0,05
<i>Humicola lanuginosa</i>	0	0	0,25	0,42	0,34	0,21
<i>Malbranchea sulfurea</i>	0	0,01	0,27	0,35	0,07	0,03
<i>Myceliophthora thermophila</i>	0	0,37	0,67	0,68	0,37	0,03
<i>Paecilomyces variotii</i>	0	0,03	0,65	0,47	0,45	0
<i>Rhizopus miehei</i>	0	0,41	0,77	0,89	0,45	0
<i>Thermoascus aurantiacus</i>	0	0	0,34	0,65	0,35	0,05

3.5.2. Effet de la source de carbone

Les souches ont été cultivées sur différents milieux où la source de carbone varie: glucose, tween 80, caséine, amidon, carboxyméthylcellulose (CMC), saccharose, acide phytique (MAP) et acide tannique (MAT). Il s'agit ici de mettre en évidence la capacité de ces souches à se développer sur ces différentes sources de carbone et de cribler indirectement la production des enzymes extracellulaires (Figure 2).

D'après la figure 2, toutes les souches semblent dégrader le glucose, l'amidon et la caséine. Les autres sources de carbone sont utilisées selon les espèces (Tableau 4).

Tableau 4. Croissance apicale (mm.h⁻¹) des différentes espèces isolées à partir des Maâsra, en fonction de différentes sources de carbone, l'incubation ayant lieu à 50°C pendant 7 jours

Espèces	Glucose	Saccharose	Amidon	Caséine	Tween	CMC	MAP	MAT
<i>A. fumigatus</i>	0,17	0,16	0,13	0,13	0,07	0,06	0	0,12
<i>R. miehei</i>	0,35	0	0,57	0,5	0,55	0,02	0,02	0
<i>H. lanuginosa</i>	0,27	0	0,3	0,29	0,27	0	0,07	0
<i>M. thermophila</i>	0,41	0,37	0,48	0,42	0,4	0,5	0,1	0
<i>T. aurantiacus</i>	0,27	0,29	0,27	0,28	0,23	0	0,04	0,03
<i>H. grisea</i>	0,12	0,11	0,13	0,12	0,02	0,19	0	0
<i>M. sulfurea</i>	0,27	0,2	0,01	0,32	0,12	0,08	0,01	0,01
<i>P. variotii</i>	0,15	0,17	0,17	0,18	0,12	0,15	0,1	0,01

Ces résultats montrent que les champignons thermophiles et thermotolérants sont capables de dégrader une variété de sources de carbone à 50°C. La croissance apicale varie selon l'espèce et même selon la souche. Ce qui est présenté dans le tableau 4 est la moyenne. Ainsi, au sein de la même espèce, qui est supposée utilisée une source de carbone donnée, on peut trouver des souches qui n'obéissent pas à cette règle. Aussi, a-t-on noté que la même souche change de couleur, d'aspect et de taille selon la source de carbone utilisée.

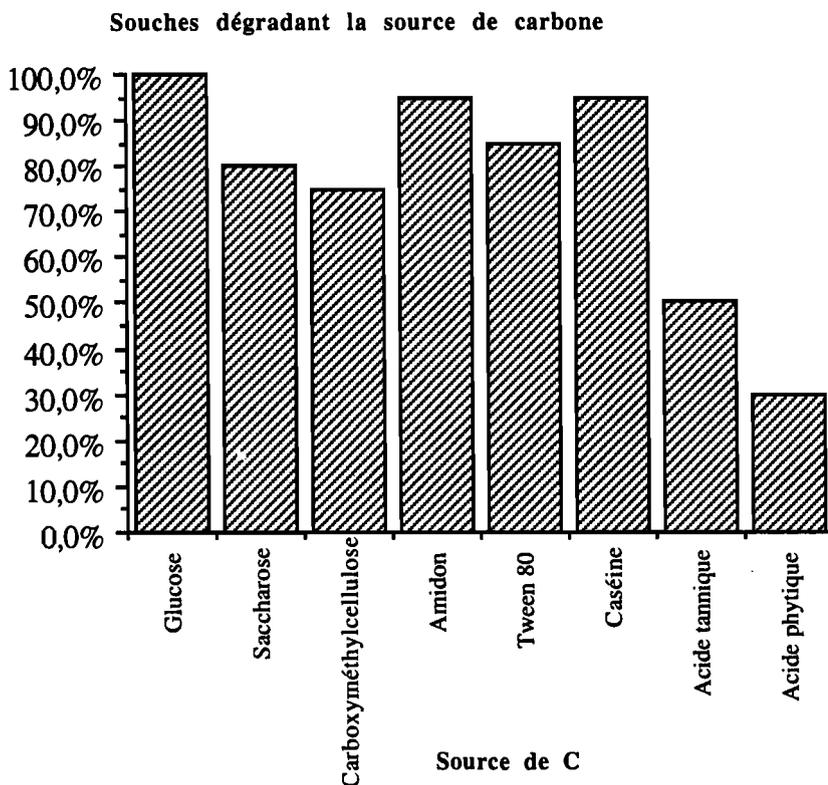


Figure 2. Pourcentage des souches isolées en fonction des différentes sources de carbone

3.5.3. Détection sur milieu solide des activités enzymatiques

Les techniques de criblage des micro-organismes, en vue de la production des enzymes, sont généralement effectuées sur des milieux liquides en agitation. Étant donné le grand nombre de souches à tester, on a adopté les techniques de détection des enzymes fongiques extracellulaires en culture superficielle suivant la méthode de Hankin & Anagnostakis (1975), qui sont peu lourdes et peu coûteuses, surtout pour la recherche de l'estérase.

Les résultats obtenus montrent que les CFT sont capables de produire des enzymes extracellulaires (Tableau 4) allant de l'amylase à la phytase en passant par la protéase, la cellulase, etc. Donc, les souches isolées sont capables d'hydrolyser et d'assimiler différents substrats comme unique source de carbone (en fonction de l'espèce) après incubation à 50°C. De ce fait, on peut suspecter la thermostabilité des enzymes mises en évidence.

Pour l'activité estérasique, le tween 80 a été utilisé comme substrat lipidique. En effet, les estérases hydrolysent mieux le tween que les autres lipides surtout en présence de *Rhizopus miehei* (Adams & Deploy, 1978).

3.6. Indice de sporulation

Les souches isolées ont présenté des indices de sporulation variables à une température d'incubation constante. La comparaison des moyennes de sporulation pour les différentes espèces a révélé un intervalle qui varie de $0,1 \cdot 10^7$ à $7 \cdot 10^7$ spores/cm².

4. CONCLUSIONS

Pour la première fois, l'étude de la biodiversité des champignons filamenteux thermophiles et thermotolérants a été consacrée aux Maâsra du Maroc.

97% des échantillons prélevés à partir des Maâsra contiennent des souches de champignons filamenteux thermophiles et thermotolérants. En moyenne, 100 souches ont été isolées par an depuis la campagne oléicole 1999-2000. Dans l'ensemble, ces souches appartiennent à 8 espèces différentes, sauf une neuvième qui est en cours d'identification.

Les souches des espèces *Aspergillus fumigatus* sont classées comme étant des champignons thermotolérants. Les espèces *Humicola lanuginosa*, *Humicola grisea*, *Malbranchea sulferea*, *Myceliophthora thermophila*, *Pæcilomyces variotii*, *Rhizopus miehei* et *Thermoascus aurantiacus* sont des champignons thermophiles, ces derniers étant fréquents dans la région sud du Maroc.

Les meilleures vitesses de croissance apicale ont été obtenues sur les milieux contenant, séparément, les protéines, les sucres simples, la cellulose et les lipides comme unique source de carbone et d'énergie. Par ailleurs, toutes les souches isolées présentent les activités enzymatiques suivantes: amylolytique, protéolytique et cellulolytique.

Aspergillus fumigatus, *Rhizopus miehei*, *Thermoascus aurantiacus*, *Myceliophthora thermophila* et *Humicola grisea* ont montré les indices de sporulation les plus élevés.

La caractérisation phylogénique des CFT est nécessaire pour confirmer leur taxonomie et pour identifier tous les métabolites primaires et secondaires.

Cette étude ouvre de nouvelles utilisations des champignons filamenteux thermophiles cultivés en fermentation en milieu solide en vue de la production d'enzymes fongiques et la valorisation des sous-produits agricoles (travaux en cours).

5. REMERCIEMENTS

Ce travail a été financé par la coopération bilatérale Franco-Marocaine: IRD, Marseille et IAV Hassan II, Rabat (Réf. PRAD 02/13) et par l'IRD-DSF (bourses de formation continue).

6. RÉFÉRENCES CITÉES

- Adams P.R. & Deploey J.J. (1978) Enzymes produced by thermophilic fungi. *Mycologia* 70: (4) 906-910.
- Alexopoulos C.J., Mims C.W. & Blackwell M. (1996) Fungal Systematics. in « Introductory Mycology ». John Wiley & Sons. New York, pp. 61-85.
- Boiron P. (1996) Organisation et biologie des champignons. Nathan, 126 p
- Botton B., Breton A., Fèvre M., Guy Ph., Laprent J.P., Reymond P., Sanglier J.J., Vayssier Y. & Veau P. (1990) Les moisissures utiles et nuisibles: importance Industrielle. Masson, Paris. 512 p.
- Carlike M.J. & Watkinson S.C. (1996) The fungi as a major group of organisms. In "The fungi". Academic Press. London. 1-7.
- Cooney G.D. & Emerson R. (1964) Thermophilic fungi. W.H. Freeman and Company, San Francisco & London. 3-28 .
- Cordova J., Roussos S., Baratti J., Nungaray J. & Loera O. (2003) Identification of Mexican thermophilic and thermotolerant fungal isolates. *Micologia Aplicada Internacional* 15 (2): 37-44.
- Cordova Lopez J.A. (1998) Isolement, identification et physiologie des champignons thermophiles en vue de la production de lipases par fermentation en milieu solide. Thèse de doctorat. Université Montpellier II. 243 p. et 4 annexes.
- Crisan E.V. (1973) Current concepts of thermophilism and thermophilic fungi. *Mycologia*. 65: 1170-1198.
- Dix N.J. & Webster J. (1995) Structure and fungal communities. In « Fungal Ecology ». Chapman & Hall. London. 39-84.
- Hankin L. & Anagnostakis S.L. (1975) The use of solid Media for Detection of Enzyme Production by fungi. *Mycologia* 67: 597-607.
- Loussert R. (1986) Les aires écologiques de l'olivier au Maroc. *OLIVAE* 18: 32-35.
- Maheshwari R., Bharadwaj G. & Bhat M.k. (2000) Thermophilic fungi: Their physiology and enzymes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 64(3) 461-488.
- MAMVA (1997) Bilan de la campagne oléicole 1996-1997.
- Pitt J.I. (1979) The Genus *Penicillium* and its teleomorphic states: *Eupenicillium* and *Talaromyces*. Academic Press, London, 634 p.
- Pitt J.I. (1998) Laboratory guide to common *Penicillium* Species, Academic press (London, new York, Toronto, Sydney, San Francisco).
- Raper K.B. & Fennell D.I. (1965) The Genus *Aspergillus*, The Williams and Wilkins Baltimore.
- Raper K.B. & Fennell D.I. (1977) Pathogenicity. In « The Genus *Aspergillus* ». R.E. Krieger Publishing Company, Inc. 82-128.
- Roquebert M.F. (1997) Les moisissures: nature, biologie et contamination. Site Web: <http://www.culture.gouv.fr/culture/conservation/fr/cours/roqueber.htm>

- Roussos S. (1985) Croissance de *Trichoderma harzianum* par fermentation en milieu solide: physiologie, sporulation et production de cellulases. Thèse d'État, Université de Provence, Marseille, 193 p.
- Schipper M.A.A. (1978) The *Rhizopus stolonifer* group and *Rhizopus oryzae*. A revision of the genus *Rhizopus*. In Studies in Mycology N°25, Institute of the Royal Netherlands Academy of Sciences and Letters, CBS, Baarn.
- Schipper M.A.A. & Stalpers J.A. (1984) The *Rhizopus microsporus* group. A revision of genus *Rhizopus*. In Studies in Mycology. N° 25. Institute the royal Netherlands Academy of Sciences and Letters. Centraalbureau voor Schimmelcultures Baarn.
- Scriban R. (1993) Production des enzymes. In Biotechnologies. Ed. R. Scriban. Tec & Doc. Lavoisier, Paris pp. 356-363.

Distribution écologique des champignons filamenteux thermophiles isolés à partir des principales Maâsra du Maroc

Le Maroc présente des biotopes très différenciés et très particuliers (désert, mer, montagnes, etc.) ce qui le rend très riche en biodiversité où la sélection des micro-organismes s'est faite naturellement. C'est dans cette optique que l'IRD (Marseille: UR 185) en collaboration avec l'IAV Hassan II (Rabat: unité de bioconversions) a démarré un programme sur la biodiversité des champignons filamenteux thermophiles isolés à partir des Maâsra (petites unités traditionnelles de trituration des olives) situées dans les principales régions oléicoles du Maroc. La première partie du travail consiste à isoler de nouvelles souches de champignons filamenteux thermophiles à 50°C, capables de sporuler et de se développer sur différents substrats utilisés comme seule source de carbone (glucose, saccharose, amidon, caséine, carboxyméthylcellulose, tween 80, acide phytique, acide tannique) afin de mettre en évidence leurs activités enzymatiques. Les résultats préliminaires ont permis d'isoler environ 400 souches de champignons filamenteux thermophiles appartenant, au moins, à huit espèces différentes: *Aspergillus fumigatus*, *Rhizopus miehei*, *Thermomyces lanuginosus*, *Myceliophthora thermophila*, *Thermoascus aurantiacus*, *Paecilomyces variotii*, *Malbranchea sulfurea*, *Humicola grisea*. Les souches de l'espèce *Aspergillus fumigatus* ont été classées comme étant des champignons thermotolérants et les espèces *Humicola lanuginosa*, *Myceliophthora thermophila*, *Humicola grisea*, *Rhizopus miehei* et *Paecilomyces variotii* comme étant des champignons thermophiles. Les souches des espèces *Aspergillus fumigatus*, *Rhizopus miehei*, *Myceliophthora thermophila* et *Humicola grisea* ont montré les indices de sporulation les plus élevés, les meilleures vitesses de croissance apicale ayant été obtenues sur des milieux contenant des protéines, des sucres simples, de la cellulose ou des lipides comme unique source de carbone et d'énergie.

Lamrani K., Ismaili-Alaoui M., Cheheb M.,
Kammas N., Iraqi Houssaini L., Hassouni H.,
Rio Bernard, Ettalibi M., Roussos Sevastianos.

Distribution écologique des champignons
filamenteux thermophiles isolés à partir des
principales Maâsra du Maroc.

In : Ismaili-Alaoui M. M. (ed.), Roussos
Sevastianos (ed.), Perraud Gaime Isabelle
(ed.). Biotechnologies et qualité des produits
de l'olivier dans le bassin méditerranéen =
Biotechnology and quality of olive tree
products around the Mediterranean basin.

Rabat (MAR), Marseille : Actes Editions, IRD,
2006, p. 293-306.

ISBN 9981-801-71-2

OliveBioteq : Séminaire, 1., 2004/11/22-24,
Errachidia