

RÉSUMÉ

De la thèse de doctorat intitulée:

“Des études sur l'activité antifongique des bactéries lactiques”

Élaboré par doctorant Adrian MATEI sous la direction scientifique du Prof. Universitaire. dr. Petruța Călina CORNEA.

Mots clés: bactéries lactiques, activité antifongique, champignons filamenteux, des métabolites, des nanoparticules d'argent, bio préservation

L'objectif de cette thèse est la sélection et l'identification des souches des bactéries lactiques avec potentiel antifongique pour une utilisation comme agents de lutte biologique et/ou biopreservants.

Les principaux objectifs sont:

1. Isolement et identification des souches phytopathogènes fongiques et/ou la contamination des aliments d'origine végétale, pour une utilisation ultérieure dans des expériences avec champignons indicateur.
2. Criblage des souches de bactéries lactiques à partir de produits traditionnels roumains fermentés pour l'activité antifongique.
3. Établir spectre d'activité antifongique des souches de bactéries lactiques sélectionnées
4. Identification et caractérisation des souches de bactéries lactiques avec des propriétés antifongiques
5. Etablir des mécanismes antifongiques des souches de bactéries lactiques sélectionnées
6. Les applications pratiques de l'effet antifongique de bactéries sur *Penicillium expansum* aux pommes
7. Application des bactéries lactiques dans la biosynthèse des nanoparticules d'argent et l'évaluation de l'effet antifongique

La thèse est structurée en deux parties (étude bibliographique et de recherches personnelles) constitués de table des matières, résumé de thèse, introduction, cinq chapitres et une bibliographie.

PARTIE I, ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE structurés comme suit:

Chapitre I – ÉTAT ACTUEL DES RECHERCHES SUR LES BACTERIES LACTIQUES ET LEUR ROLE DANS LE CONTROLE DE LA CROISSANCE FONGIQUE où sont présentés des synthétises de la littérature sur la contamination fongique de la nourriture, les principales méthodes de contrôle de la contamination par les mycotoxines des champignons filamenteux, morphologie générale, la physiologie, les particularités métaboliques, la classification et l'activité antifongique des bactéries lactiques. On a présenté les facteurs qui

influence l'activité antifongique, le rôle principal des métabolites antifongiques produits par diverses espèces de bactéries lactiques, les interactions avec les champignons filamenteux et les applications courantes des bactéries lactiques dans l'industrie alimentaire pour le contrôle biologique de la contamination fongique et les bactéries lactiques impliqués dans la biosynthèse des nanoparticules d'argent.

PARTIE II, RECHERCHES PERSONNELLES, est composé de quatre chapitres qui exposent le but de la thèse, les matériaux et les méthodes utilisées pour atteindre les objectifs, les résultats et les discussions sur leur sens par rapport à la recherche dans ce domaine, les conclusions.

Chapitre II – BUT ET OBJECTIFS DU RECHERCHES MENÉES DANS LA THÈSE DE DOCTORAT

Chapitre III – MATÉRIEL ET MÉTHODES décrit les procédés pour la caractérisation des souches de bactéries lactiques, l'isolement et la caractérisation de nouvelles espèces fongiques, des procédés de criblage de bactéries lactiques, soulignant l'effet antifongique sur des supports solides et liquides. Ils ont décrit en soulignant les méthodes utilisées pour produire des agents antifongiques (acides organiques, bio surfactants, exopolysaccharides, laccase), les techniques de chromatographie spécifiques utilisés, les nanotechnologies de biosynthèse des nanoparticules d'argent et de leurs paramètres de caractérisation. Il présente l'expérience *ex vivo* sur l'application de bactéries lactiques pour la bio préservation des pommes et les méthodes statistiques utilisées dans le traitement des résultats.

Chapitre IV – RÉSULTATS ET DISCUSSION est divisé en sept sous-chapitres contenant les résultats de recherches menées en 2012-2015 dans le stage de doctorat dans le laboratoire de génie génétique et de laboratoire d'enzymologie de la Faculté de Biotechnologie Bucarest. Tout au long de ce chapitre présente 113 figures originales, représentant des graphiques, des images photographiques et 19 tables.

Dans le premier sous-chapitre sont présentés les résultats sur l'isolement, l'identification et la compilation d'une collection de 11 souches fongiques nouvelles appartenant aux genres *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Trichotecium* et *Stachybotrys* connu sous le nom des agents pathogènes des cultures ou associé aux de contamination de la chaîne alimentaires, ayant des propriétés de virulence non mitigé par culture *in vitro*. L'avantage de les utiliser comme champignons indicateurs donne aux bactéries lactiques qui les inhibent la possibilité de l'utilisation dans des technologies de contre-mesures efficaces.

Deuxième section présente les résultats de criblage de 38 souches de bactéries lactiques testés contre la *Aspergillus ochraceus* et *Penicillium digitatum*. Parmi ceux-ci, 30 souches (79%) ont montré une activité antifongique contre des deux espèces. *P. digitatum* souche est sensible à

l'action de bactéries lactiques testées, par rapport à *A.ochraceus*. Ils ont montré que les souches de LAB 13, LAB 15, LAB 35, LAB 43, LAB 58, LAB 61 LAB 113, LAB 118 et LAB 122, conduisant à la formation de zones d'inhibition de croissance du mycélium avec un diamètre de plus de 25 mm, au moins l'une des espèces fongiques.

Sont présentés aussi les résultats des tests qui mettent en évidence l'effet antifongique de huit souches sélectionnées de bactéries lactiques isolées sur les nouvelles souches fongiques de la collection du laboratoire d'atteindre spectre antifongique. Après avoir testé l'effet antifongique sur *A.flavus* M4, *A.niger* M3, *A.ochraceus* P, *A.ochraceus* BZ, *A.ochraceus* 5S, *A.fumigatus*, *P.expansum*, *P.digitatum*, *F.verticillioides*, *T.roseum* et *S.chartarum* on a constaté que les souches les plus efficaces sur la plupart des espèces indicatrices, étaient LAB 13, LAB 15, LAB 43, LAB 58 et Lpl.

Le quatrième sous-chapitre présente l'identification et la caractérisation des souches de bactéries lactiques sélectionnées pour les propriétés antifongiques.

Identification moléculaire des bactéries lactiques sélectionnées par le BOX-PCR a montré que si pour les souches LAB 13, LAB 15, LAB 35 et LAB 58 bandes profilées, l'ADN résultant par amplification sont similaires à ceux obtenus pour la souche de *Lactobacillus plantarum* Lpl, dans le cas de la souche LCM5 amplicons profil est différent. Aussi dans les souches LAB 64 et LAB 43 amplicons profil présente des différences importantes qui soutient l'idée qu'ils appartiennent à des espèces différentes.

Utilisation d'ERIC-PCR a donné des résultats plus mitigés par rapport à BOX-PCR mais ils confirment généralement les questions mises en évidence dans le premier cas.

Identification des souches de bactéries lactiques comme appartenant à l'espèce *L.plantarum* créer la base de leur utilisation pratique, étant donné que telles espèces des bactéries sont considérées comme sans danger pour les humains et les animaux.

Certaines souches de bactéries lactiques ont produit des exopolysaccharides, témoigne par microscopie optique et électronique à balayage (SEM) et la quantité de celui-ci varie en fonction de la souche et des conditions de culture. Il a montré les effets de la température, le pH et la source de carbone sur la croissance des bactéries lactiques et production des EPS. Lactose était le sucre préféré par la plupart des souches testées comme source de carbone pour produire des exopolysaccharides en excès. En outre, de façon surprenante, la quantité d'EPS était généralement supérieure lorsque le pH a été augmenté (pH 7,5), et la température optimale pour la culture est $38\pm 2^{\circ}\text{C}$.

Les résultats pour toutes les souches de bactéries lactiques à 24 heures après la mesure de la densité optique (OD_{600nm}) montre des valeurs élevée dans les conditions de température de 28°C , pH 7,5 et en utilisant du glucose (10%) comme source de carbone.

Les essais pour la présence de laccase ont montré des petits halos pour les souches LCM5, Lpl, Lpa, LAB 43 et LAB 13, halos clairs détectés dans certaines cultures mixtes (*F.verticillioides* + Lpa; *F.verticillioides* + LAB 43; *T.roseum* + Lpa; *T.roseum* + LAB 15; *T.roseum* + LAB 43; *P.digitatum* + Lpa; *A.ochraceus* + LAB 15; *S.chartarum* + LAB 43) qui suggère l'existence d'interactions spécifiques entre les métabolites synthétisés par des organismes qui interagissent et ils interviendraient dans les phénomènes biochimiques de l'antagonisme entre bactéries et des champignons.

La chromatographie Pfeiffer a confirmé l'antagonisme entre les métabolites des souches de bactéries lactiques et l'espèce fongique indicateur par changeant l'apparence des chromatogrammes à la zone de contact et formant des lignes de précipitation.

Sous-chapitre cinq présente les résultats concernant les mécanismes d'action des souches des bactéries lactiques ayant des propriétés antifongiques. D'une manière générale, les aspects de la microscopie optique a montré que les changements dans le mycélium fongique par les composés diffusibles synthétisés à partir de bactéries lactiques sont similaires: la lyse de la paroi cellulaire, vacuolisation, hyphes torsion, mais leur intensité est différente. Aussi dans les zones d'inhibition ont été observées altérations des conidiophores et des conidies.

Tester les bactéries lactiques contre la formation de biofilm fongique a montré que les souches LAB 13, LAB 15 et LAB 43 ont inhibées la croissance et le développement du mycélium fongique pour tous les isolats testés et ont bloquées, par les métabolites synthétisés, l'agrégation des cellules fongiques qui adhèrent aux parois des vaisseaux de la culture et la formation de biofilm fongique dans la plupart des espèces indicateur.

Quantifier la production d'acides organiques par HPLC a montré que la plupart des souches testées produit acide lactique après 24 heures d'incubation, et cet acide a tendance à augmenter dans les prochains jours et de petites quantités d'acide acétique et fenillactic hydroxifenillactic. L'efficacité des bactéries en matière de production d'acide lactique a été décroissante: LAB 15 > LPL > LAB 35 > LAB 58 > LAB 43.

Pour la souche LAB 43 qui présentait une forte activité antifongique contre la plupart des champignons indicateurs contre lesquelles a été testé a prouvé que les acides organiques d'intérêt ont été très faibles. Cela signifie la possibilité d'intervention des autres mécanismes antifongique.

Les résultats des expériences avec les filtrées de culture stérile et stérile neutralisé confirme que pour la majorité des souches de bactéries lactiques l'activité antifongique est due à la synthèse des acides organiques. Pour les souches LAB 43 et LAB 58, on peut dire que l'activité d'inhibition est due à la biosynthèse des acides organiques (l'encontre de certaines cibles fongique) et la production d'autres agents antifongiques. En outre, pour certaines souches

bactériennes l'activité antifongique est de type fongicide (telles que les souches LAB 43 et LAB 58), tandis que pour les autres est une action fongistatique, diminuant au cours d'une incubation prolongée.

Les résultats indiquent que les souches de bactéries lactiques produisent bio surfactant ayant caractère anionique.

La capacité des bio surfactants produits par des souches de bactéries lactiques d'adhérer à des surfaces solides peut être un autre moyen efficace pour lutter contre la contamination fongique des denrées alimentaires et inhiber leur développement. En outre, par la corrélation des résultats relatifs aux bio surfactants avec les résultats concernant de l'inhibition d'agrégats de mycéliums et des biofilms fongiques ont peut être apprécié que, au moins pour les souches de LAB 13, LAB 35 et LAB 43 ces propriétés sont liées à la production de bio surfactants.

Application pratique sur l'effet antifongique de bactéries lactiques, indiquées dans le sous-chapitre six a démontré que les souches Lpl, LAB 43, LCM5 et Lpa avait effet protecteur contre *Penicillium expansum* sur pommes variété Jonathan Voinesti ayant une haute potentiel de lutte biologique comme une alternative à produits chimiques de combat.

Sous-chapitre sept présents de nouveauté sur l'utilisation des souches de bactéries lactiques isolées à partir des produits roumains traditionnels fermentés pour la biosynthèse de nanoparticules d'argent. Les nanoparticules d'argent bio synthétisés en utilisant les filtrats des bactéries lactiques, et qui ont été caractérisées par microscopie électronique à transmission (MET) ont montré en général une bonne dispersion, la forme sensiblement sphérique avec des bandes parallèles qui prouvent la structure cristalline et de la taille à moins de 45 nm.

Les souches qui produisent des nanoparticules d'argent avec l'activité antifongique accrue contre *Aspergillus flavus* M4, *Aspergillus ochraceus* BZ et *Penicillium expansum* étaient LAB 132, LCM 5, LAB 58 et LAB 35, suivie par LAB 43 et LAB 13 dont l'activité antifongique a été différent contre les espèces fongiques, mais le plus souvent supérieure à celle des souches de référence (Lpa et Lpl). L'activité antifongique de nanoparticules d'argent synthétisés par les souches de bactéries lactiques a été maintenue plus de 14 jours, ce qui suggère leur effet fongicide.

Chapitre V – CONCLUSIONS comprend les conclusions générales des expériences et des contributions originales de l'accent sur l'étude de l'effet antifongique de bactéries lactiques et de leurs applications pratiques possibles en matière de nanotechnologie.

Le caractère d'originalité et d'innovation de ce travail est d'améliorer les méthodes de bio préservation et lutte biologique en utilisant de nouvelles souches de bactéries lactiques performantes capable de produire des composés antagonistes avec impact sur le contrôle biologique des champignons phytopathogènes et/ou de contaminants de denrées alimentaires

d'origine végétale.

La bibliographie comprend 283 titres d'ouvrages scientifiques de spécialité publiés national et international.