



UNIVERSITÉ MOHAMED EL BACHIR EL IBRAHIMI
BORDJ BOU ARRERIDJ

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة محمد البشير الإبراهيمي برج بوعريريج

Université Mohamed El Bachir El Ibrahimi - B.B.A.

كلية علوم الطبيعة والحياة وعلوم الارض والكون

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et des Sciences de la Terre et de l'Univers

قسم العلوم البيولوجية

Département des Sciences Biologiques



UNIVERSITÉ MOHAMED EL BACHIR EL IBRAHIMI
BORDJ BOU ARRERIDJ

Mémoire

En vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences biologiques

Spécialité: Microbiologie appliqué

Intitulé

**Evaluation de l'activité de l'huile essentielle de
Schinus molle vis-à-vis d'*Aspergillus niger*,
moisissure du blé de stockage non traité.**

Présenté par : BENNECIF LAMIA
OUALI ZOUINA

Soutenu le : 15 / 09 /2019;

Devant le jury :

Président :	M ^r ZIAD Abdelaaziz	MAA	(Université de BBA)
Encadrant :	M ^{me} BENSEGHIR Hadjira	MAA	(Université de BBA)
Encadrant :	Mr SADRATI Nouari	MAA	(Université de BBA)
Examineur :	M ^{me} ZERROUG Amina	MAA	(Université de BBA)

Année universitaire : 2018/2019

Remerciements

Avant tous, nous remercions Dieu tout puissant de nous avoir accordé la force, le courage et les moyens afin de pouvoir accomplir ce modeste travail. Nous tenons à exprimer notre reconnaissance à Mr SADRATI et Mm BENSGHIR H. Pour avoir proposé ce thème et pour leurs encadrements. Nous remercions Mr ZIAD A. pour avoir accepté de présider le jury de soutenance. Nos remerciements s'adressent également à Mme ZERROUG A. d'avoir accepté d'examiner ce travail, également à Mm REGOUI C. pour sa contribution à l'identification du matériel végétale. Nous devons une mention particulière aux ingénieures de laboratoire pour leur efficacité du point de vue méthodologie au niveau du laboratoire de microbiologie.

Dédicaces

*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, que dieu te garde, à toi mon
père.*

*A la lumière de mes jours, la source de mes
efforts, la flamme de mon cœur, ma vie et mon
bonheur ; maman que j'adore.*

*A mes frère AMINE et OUSSAMA que j'aime
énormément, ainsi ma grande famille
BENHACINE et OULI pour leur soutien morale*

*Aux personnes dont j'ai bien aimé la présence
dans ce jour mon binôme LAMIA, ma sœur et
toute ma vie : AZIZA, mes aimables amies :
NOUARA, KAHINA WEDJDENE, MARIA.
je tiens à remercier «Allah» qui m'a donné la
force et la volonté*

Pour terminer ce modeste travail.

ZOUINA

Dédicaces

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, que dieu te garde dans son vaste paradis, à toi mon père.

A la lumière de mes jours, la source de mes efforts, la flamme de mon cœur, ma vie et mon bonheur ; maman que j'adore.

A mes frère OUSSAMA et ABD ELBASSET que j'aime énormément, ainsi mes sœurs MERIEM et AICHA pour leur soutient morale

Aux personnes dont j'ai bien aimé la présence dans ce jour mon binôme ZINA, mes aimables amies : NOUARA et WEDJDEN.

je tiens à remercier «Allah» qui m'a donné la force et la volonté

Pour terminer ce modeste travail.

LAMIA

ملخص

يهدف العمل الحالي الى : معرفة وتحديد أنواع الفطريات الموجودة في القمح القاسي *triticum durum* المخزنة لمدة ثلاثة سنوات و التي توفرها مزرعة في عين بلعمران بولاية برج بوعريريج وتقييم نشاط الزيوت العطرية الأساسية المستخلصة من ثمار شجرة *Schinus molle*.

تم الحصول على عزلتين فطريتين وتحديدهما وفقا للمعايير الظاهرية و المجهرية (*Aspergillus niger*,

pinicilium sp).

يتم اختبار نشاط الزيوت الأساسية المستخلصة لفاكهة *Schinus molle* بواسطة التحلل المائي

hydrodistillation على الفطريات بطريقة البقعة (Spot) وذلك لحساب نسبة التثبيط.

بالنسبة للزيوت الأساسية أظهرت النتائج التي تمت الحصول عليها أن هذا الزيت له نشاط فطري منخفض ضد

Aspergillus niger و هو نوع يؤثر بشكل كبير على جودة القمح المخزن.

الكلمات المفتاحية: القمح الصلب المخزن, *Pinicilium sp*, *Aspergillus niger*, الزيوت الأساسية, *Schinus*

,*molle*

Abstract

The present work has the following objectives: to identify molds of durum wheat (*Triticum durum*) stored for three years, provided by a farm in Ain Belomrane, wilaya de bordj bou arréridj, and to evaluate, in vitro, the activity of the essential oil of the fruit of the tree Schinus molle, aromatic plant used in traditional therapy, with the aim of using it as a food preservative.

Two fungal isolates were obtained and identified according to the macro and microscopic criteria, *Penicillium* sp. and *Aspergillus niger*,

The antifungal activity of the essential oil, the extract of *schinus molle* fruit was obtained by hydrodistillation, is tested by the spot seeding method (spot) in PDA medium to calculate the percentage inhibition.

As for the essential oil, the results obtained show that this oil has a low fungistatic activity against *Aspergillus niger*, a species that significantly affects the quality of stored wheat.

Key words: Stored hard wheat, *Penicillium* sp, *Aspergillus niger*, Hydrodistillation, Essential oil, Schinus molle .

Résumé

Le présent travail se propose comme objectifs : identifier des moisissures du blé dur (*Triticum durum*) stocké depuis trois ans , fourni par une ferme de Ain Belomrane, de la wilaya de bordj bou arréridj, et évaluer, *in vitro*, l'activité de l'huile essentielle des fruits de l'arbre *Schinus molle* ,plante aromatique utilisée en thérapie traditionnelle, dans le but de l'utiliser comme un conservateur alimentaire.

Deux isolats fongiques ont été obtenus et identifiés selon les critères macro et microscopiques, ce sont *Penicillium* sp. et *Aspergillus niger*.

L'activité antifongique de l'huile essentielle, extrait des fruits de *schinus molle a* été obtenu par hydrodistillation, est testée par la méthode d'ensemencement en touche (en spot), en milieu PDA afin de calculer le pourcentage d'inhibition.

Quant à l'huile essentielle, les résultats obtenus montrent que cette huile a une faible activité fongistatique vis-à-vis d'*Aspergillus niger*, espèce qui altère d'une façon prononcée la qualité du blé stocké.

Mots clés: Blé dur stocké, *Penicillium* sp., *Aspergillus niger* , huile essentielle, *Schinus molle*.

Table des matières

Résumé	
Liste des figures	
Liste des photographies	
Liste des tableaux	
Liste d'abréviations	
Introduction générale.....	01
Partie I : Synthèse bibliographique	
• Chapitre I : Le blé et moisissures de stockage	
I.1. Définition du blé.....	03
I.2. Taxonomie du blé.....	03
I.3. Stockage du blé.....	03
I.3.1. Stockage traditionnel du blé en Algérie.....	04
I.3.2. Stockage du blé en silos.....	04
I.4. Facteurs causant l'altération du blé.....	04
I.4.1. Les facteurs environnementaux	04
I.4.1.1. Les facteurs abiotiques.....	04
I.4.1.1.1. L'humidité.....	04
I.4.1.1.2. La température.....	05
I.4.1.2. Les facteurs biotiques.....	05
I.4.1.2.1. Altérations enzymatiques	05
I.4.1.2.2. Facteurs mécaniques ou physiques.....	06
I.5. Flore fongique du blé stocké	06
I.5.1. Caractères généraux.....	06
I.5.2. Flore de stockage	06
I.5.2.1. Le genre <i>Aspergillus</i>	06

I.5.2.2. Le genre <i>Penicillium</i>	07
I.6. Isolement des moisissures.....	07
I.7. Identification des moisissures	08
<ul style="list-style-type: none">• Chapitre II : <i>Aspergillus niger</i>	
II.1. Généralité.....	09
II.2. Définition.....	09
II.3. Les facteurs déterminants.....	09
II.4. Taxonomie.....	10
II.5. Les critères de classification	10
II.5.1. Macroscopique.....	10
II.5.2. Microscopique.....	10
II.6. Habitat.....	11
II.7. Mycotoxines.....	11
II.8. Les effets néfastes de l' <i>Aspergillus niger</i>	13
<ul style="list-style-type: none">• Chapitre III : <i>Schinus molle</i>	
III.1. Définition.....	14
III.3. Classification	15
III.2. Description botanique.....	14
III.4. Caractères généraux	15
III.5. Distribution et habitat	16
III.6. Huile essentielle.....	16
III.6.1. Composition chimique des huiles essentielles.....	16
III.7. Caractère toxique de la plante.....	17

Partie II : Partie expérimentale

IV. Matériel et Méthodes

• **Chapitre I : Etude mycologique du blé stocké non traité**

IV.1.1. Echantillonnage.....	18
IV.1.2. Préparation du milieu de culture	
IV.1.3. Isolement et identification des moisissures.....	18
IV.1.3.1. Désinfection des échantillons.....	19
IV.1.3.2. Séchage de l'échantillon.....	19
IV.1.3.3. Broyage de l'échantillon.....	19
IV.1.3.4. Isolement des moisissures.....	19
IV.1.4. Purification des isolats.....	19
IV.1.5. Identification des isolats.....	20
IV.1.5.1. Etude des caractères cultureux.....	20
IV.1.5.2. Etude des caractères morphologique microscopique.....	20
IV.1.6. La conservation.....	20

• **Chapitre II : Etude de l'effet de l'huile essentielle des fruits de *Schinus molle* sur *Aspergillus niger***

IV.2.1. Extraction de l'huile essentielle des fruits de <i>Schinus molle</i>	21
IV.2.1.1. Matériel végétal.....	21
IV.2.1.2. Méthode d'extraction, l'hydrodistillation.....	21
IV.2.2. Essai de l'évaluation de l'activité de l'huile essentielle sur <i>Aspergillus niger</i>	22
IV.2.2.1. Méthode d'ensemencement en touche (en spot).....	22

V. Résultats et discussion

V. 1. Les résultats.....	23
V. 1.1. Etude mycologique des grains de blé stocké non traités.....	23
V. 1.2. Purification des isolats.....	23
V. 1.3. Identification macroscopique.....	24
V. 1.4. Identification microscopique.....	24

V. 1.5. Etude de l'activité antifongique de l'extrait des fruits de l'arbre <i>Schinus molle</i>	25
V.1.5.1. Calcule de pourcentage d'inhibition.....	27
V.2. Discussion	27
VI. Conclusion et perspective	29

Annexe

Références bibliographique

Résumé

Liste des figures

Figure 01: *Aspergillus niger* sous microscope optique ($\times 40$).....11

Figure 02: *Schinus molle* 15

Liste des photographies

Photographie 01: L'échantillon de blé.....	18
Photographie 02: Les fruits de l'arbre <i>Schinus molle</i>	21.
Photographie 03: Dispositif d'extraction des huiles essentielles de type Clevenger.....	21.
Photographie 04: Colonies d' <i>Aspergillus niger</i> et de <i>Penicillium Sp.</i> des grains de blé stockés non traités.....	23
Photographie 05: L'obtention des souches pures après plusieurs repiquages.....	23
Photographie 06: Colonie de <i>Penicillium sp.</i>	24
Photographie 07: Colonies d' <i>Aspergillus niger</i>	24
Microphotographie 08: <i>Penicillium sp.</i> au grossissement X40.....	25
Microphotographie 09: Spores et tête d' <i>Aspergillus niger</i> au grossissement X40.....	25
Photographie 10: L'extrait des fruits de l'arbre <i>Schinus molle</i>	25
Photographie 11: Les colonies des résultats de septième jour.....	26

Liste des tableaux

Tableau I: Classification de blé.....	03
Tableau II: Les paramètres de culture de l'espèce <i>Aspergillus niger</i>	09
Tableau III: La position systématique d' <i>Aspergillus niger</i>	10
Tableau IV: Les mycotoxines produit par <i>Aspergillus niger</i>	12
Tableau V: Classification botanique de <i>schinus molle</i>	14
Tableau VI: Les résultats de septième jour.....	26

Liste d'abréviations

Aw : Activity water (Activité de l'eau).

OTA : Ochratoxine A

FB1 : Fumonisine B1

pH : Potentiel d'hydrogène

Introduction

Le blé constitue une des céréales les plus cultivées dans le monde. C'est une source importante de protéines pour l'alimentation humaine. En Algérie, les produits céréaliers, dont le blé, occupent une place stratégique dans le système alimentaire et dans l'économie nationale (**Djermoun, 2009**). Cependant, la conservation post-récolte est le seul moyen d'assurer le lien entre la récolte intervenant une fois dans l'année et la consommation, qui est permanente et obligatoire (**Waongo et al., 2013**).

Cette denrée est généralement attaquée par plusieurs ravageurs dont les insectes et les moisissures. Les dommages causés respectivement par premiers sont loin d'être sous-estimés, mais ceux causés par les seconds ne devraient pas être négligeables (**Waongo et al., 2013**).

La microflore et les moisissures, particulièrement, constituent, au cours du stockage, la cause principale de diverses altérations et par la suite de pertes inestimables. Ce sont surtout les *Aspergillus* et les *Penicillium*, ravageur normaux et habituels des grains qui sont susceptibles de se développer abondamment, au cours du stockage défectueux. En effet, la contamination qui débute au champ, va se poursuivre au cours des processus de récolte, de séchage, de manutention et du stockage (**Meghazi, 2015**).

L'attaque du blé stocké par ces moisissures a pour conséquences; l'altération de la qualité du grain qui va se répercuter sur la valeur nutritionnelle des produits dérivés et la production de mycotoxines (**Meghazi, 2015**).

Les moisissures constituent un agent de détérioration très important. Elles sont omniprésentes dans la nature et possèdent un arsenal enzymatique très varié. Elles peuvent se développer sur différents substrats et entraîner des modifications physiques (aspect, goût, odeur) et chimiques (modification des qualités nutritives). Ainsi, on estime que le développement incontrôlé de micromycètes est à l'origine de la perte de 5 à 10% des récoltes mondiales et de la diminution de la qualité sanitaire (allergie, agents toxiques responsables de graves intoxications humaines et Animales (**Gacem et al., 2012**).

Par ailleurs, dans des conditions propices de température, d'humidité, de pH et de composition du substrat, les moisissures peuvent synthétiser des métabolites secondaires toxiques qualifiées de mycotoxines. Ces dernières représentent un danger pour la santé publique.

Depuis des milliers d'années, l'humanité a utilisé diverses plantes, trouvées dans son environnement, afin de traiter et soigner toutes sortes de maladies. Ces plantes représentent un

réservoir immense de composés potentiels, attribués aux métabolites secondaires. Ces derniers ont l'avantage d'être d'une grande diversité de structure chimique et possèdent un très large éventail d'activités biologiques (**Tabuc, 2007**).

L'évaluation de ces activités représente une tâche très intéressante qui peut faire l'objet de nombreuses études. Actuellement, les plantes aromatiques possèdent un atout considérable grâce à la découverte progressive des applications de leurs huiles essentielles dans les soins de santé ainsi que leurs utilisations dans d'autres domaines d'intérêt économique.

En Afrique du nord, le faux poivrier ou *Sinus molle* L, arbre qui a été introduit comme espèce ornementale à la fin des années 1900 par les colonisateurs. Son introduction réussie dans un domaine non-natif est attribuée à sa tolérance à une forte sécheresse et à la chaleur (**Iponga, 2009**). Dans sa région native (l'Amérique du Sud), cette espèce très aromatique a fait objet de nombreuses enquêtes pour évaluer ses activités antibactérienne, antifongique, anti inflammatoires, insecticide et allélopathique (**Yueqin et al., 2003**). Cependant, la plupart des études antérieures concernant la composition de l'huile essentielle de cette espèce se sont concentrées sur les fruits ; peu de travaux sont réalisés sur les feuilles, et sur l'activité insecticide. Par la présente étude nous visons connaitre si l'huile essentielle extraite du fruit de *Schinus molle* exerce un effet inhibiteur ou non sur la croissance d'*Aspergillus niger*, ravageur du blé stocké, dans le but de l'utiliser éventuellement comme un bioconservateur.

Notre travail comporte deux parties :

- Une synthèse bibliographique à trois chapitres
- Une partie expérimentale à deux chapitres

Et se termine par une conclusion et perspectives.

Chapitre I : Le blé et moisissures de stockage

I.1. Définition du blé

Le blé est l'une des principales céréales cultivées dans le monde, avec le riz, le maïs, l'orge et le sorgho. Elles fournissent plus de 60% des calories et des apports en protéines de l'alimentation humaine. Une des particularités du blé réside dans la forte teneur en amidon (70%) et en gluten (15%) de ses grains. Le blé est au centre de l'alimentation humaine en tant qu'ingrédient principal pour la fabrication du pain, de la semoule, des biscuits et des pâtes.

L'espèce majoritairement cultivée (> 90% des cultures) est le blé tendre *Triticum aestivum* ssp. *aestivum*, utilisé principalement pour la fabrication du pain. Le blé dur *Triticum turgidum* ssp. *durum* est utilisé pour la fabrication des pâtes alimentaires et des semoules. C'est la différence de dureté du grain (dur ou tendre) qui les destine à ces utilisations différentes (Meghazi, 2015).

I.2. Taxonomie du blé

Le blé est une plante annuelle appartenant à la famille des graminées qui s'adapte à des sols et des climats variés. La classification botanique de cette plante est donnée comme suit :

Tableau I : classification de blé (Meghazi, 2015)

Famille	Gramineae
Sous-famille	Festucoideae
Tribu	TriticeaeAveneae
Sous-Tribu	Triticineae
Genre	<i>Triticum</i>
Nom commun	Blé tendre (<i>Triticum aestivum</i> L. subsp. <i>aestivum</i>). Blé dur (<i>Triticum durum</i>).

I.3. Stockage du blé

La consommation quotidienne est assurée par une seule récolte, quelquefois deux dans l'année d'où la nécessité du stockage. En outre, les grains stockés sont utilisés comme des semences en attendant la saison suivante (Druvefors, 2004). Plus l'humidité des grains est importante à la récolte, plus les conditions sont favorables au développement des

microorganismes. De bonnes pratiques de conservation consistent à éviter son altération en contrôlant les principaux facteurs de détérioration (**Molinie *et al.*, 2005**).

Autrement dit, le but des technologies de conservation est de préserver par des moyens appropriés l'intégrité des principales qualités des graines qui ne peuvent pas être améliorées pendant le stockage. Les premiers systèmes de stockage étaient de grands paniers faits de roseaux ou fioles d'argiles qui sont enfoncées dans le sol, ainsi que des puits, des structures de bois et des puits garnis de paille (**Druvefors, 2004**).

I.3.1. Stockage traditionnel du blé en Algérie

Le paysan algérien, sur les hauts plateaux, conservait surtout le produit de ses champs d'orge et de blé, dans des enceintes creusées dans un sol argileux ; c'est ce qu'on appelle « El matmour » ou dans des sacs en toile de jute, entreposés dans divers locaux, magasins ou hangars. La trop forte humidité et les eaux d'infiltration sont les inconvénients majeurs de cette méthode de stockage favorisant le développement des moisissures et les phénomènes de fermentations bactériennes (**Gacem, 2011**).

I.3.2. Stockage du blé en silos

De nos jours, les silos permettent de stocker les différents types de céréales en même temps. Ce sont des enceintes cylindriques en béton armé ou en métal inoxydable. L'emploi des silos réduit la main d'œuvre, augmente l'aire de stockage et supprime l'utilisation des sacs onéreux (**Gacem, 2011**).

I.4. les facteurs causant l'altération du blé

L'altération du blé peut survenir suite à l'action de différents facteurs

I.4.1. Les facteurs environnementaux

Les facteurs environnementaux sont de deux types : facteurs abiotiques et ceux biotiques.

I.4.1.1 Les facteurs abiotiques

I.4.1.1.1. L'humidité

La faible teneur en humidité est le facteur le plus important pour la conservation des grains lors du stockage. Les grains, stockés avec le contenu d'humidité élevé, sont soumis à des pertes élevées causées par l'attaque des insectes et des champignons (**Multon, 1982**).

I.4.1.1.2. La température

La température joue un rôle important dans la conservation des grains. Elle est le facteur le plus important qui affecte la qualité du grain au cours de stockage. Elle intervient d'une part sur la valeur l'Aw et d'autre part sur les vitesses de réactions chimiques et enzymatiques et donc la croissance des microorganismes. (Au cours de la conservation, plus la température est élevée plus les réactions biologiques des microorganismes sont rapides **(Multon,1982)**).

I.4.1.2 Les facteurs biotique

Un lot de grains entreposé comporte inévitablement au moins deux entités vivantes : les grains eux-mêmes et les micro-organismes. De façon non obligatoire, mais cependant fréquente, on y trouve également associés des insectes, des acariens, voire de petits vertébrés (rongeurs, oiseaux) **(Multon, 1982)**.

La microflore des grains est banale, à tendance xérophile et cosmopolite. Les bactéries, les levures et les mycètes filamenteux constituent un envahisseur interne et/ou contaminant externe qui font l'objet d'altération biologique **(Gacem, 2011)**. Les virus paraissent négligeables, et les lichens sont parmi les rares organismes vivants capables de supporter sans dommage une grande siccité : leurs teneurs en eau se situent entre 5 et 40%, contre 75 à 97% pour le reste du monde vivant **(Multon, 1982)**.

I.4.1.3. Altérations enzymatiques

Les altérations enzymatiques dues aux enzymes propres aux grains se manifestent de façon variée. Ce sont d'abord des hydrolases, agissant sur les protéines, les lipides et les glucides donnant des produits qui peuvent se dégrader ensuite par autres voies **(Multon, 1982)**. C'est ainsi que les lipases libèrent des acides gras qui sont ensuite oxydés par la lipoxygénase. Il ne faut pas négliger cette altération enzymatique car certains produits peuvent être toxiques tel que les produits de la fermentation. Les réactions de Maillard donnent aussi un grand nombre de composés intermédiaires (dont l'activité physiologique a été reconnue) aboutissant dans leur stade ultime à la formation de composés brunatres avec une destruction des vitamines B1, E et les caroténoïdes **(Gacem, 2011)**.

I.4.1.4. Facteur mécanique ou physique

Les altérations d'origine mécanique sont dues à des chocs entraînant des cassures et favorisant les autres causes d'altération. L'utilisation des radiations telles que les rayons gamma et les rayons ultra-violet (UV) peuvent provoquer des altérations radiochimiques tels que la pyrolyse, redistribution de l'eau dans le grain et l'adhésion de l'amidon et des constituants protéiques (**Gacem, 2011**).

I.5. Flore fongique du blé stocké

I.5.1. Caractères généraux

Les moisissures sont des champignons microscopiques. Ce sont des organismes pluricellulaires dont l'appareil végétatif, le thalle, est formé de longs filaments ramifiés et souvent cloisonnés que l'on appelle des hyphes. Lorsque la croissance est suffisamment avancée, l'ensemble des hyphes constitue un mycélium visible à l'œil nu. (**Nicklin et al., 2000**).

La structure filamenteuse du thalle les rend particulièrement aptes à coloniser des substrats solides. En raison de leurs aptitudes écologiques et physiologiques ; les moisissures sont de loin les microorganismes les plus redoutables pour les grains stockés (**Multon, 1982**).

I.5.2. Flore de stockage

Les facteurs environnementaux peuvent exercer une pression sélective influençant la structure de la communauté et la dominance de quelques espèces mycotoxigéniques (**Magan et al., 2003**). Les moisissures des grains de blé stockés sont présentes sous forme de mycélium dormant sous le péricarpe ou spores en dormance sur la surface du grain. Les principaux genres rencontrés sont: *Aspergillus* et *Penicillium* en raison de leurs capacités de se développer sur tous substrats possibles et dans une large gamme de température et d'humidité (**Mathew et al., 2011**).

I.5.2.1. Le genre *Aspergillus*

Chaque espèce de moisissures de stockage a ces conditions de développement (**Christensen et Kaufman, 1969**). Dans le blé stocké, les moisissures du genre *Aspergillus* se multiplient d'autant plus rapidement que la température (jusqu'à 40°C) et l'activité de l'eau sont élevées (Feillet, 2000). Les espèces d'*Aspergillus* les plus fréquemment observées dans

le grain de blé stocké sont surtout : *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger* et *Aspergillus fumigatus* (Mathew *et al.*, 2011). Si le blé est stocké à une teneur d'humidité de 14 à 15% et à une température d'environ 70°C, il sera lentement envahi par d'autres espèces notamment *Aspergillus restrictus*. Cette dernière représente l'espèce qui prédomine dans le blé stocké pendant quelques mois si l'humidité est inférieure à 15%.

Au-dessus de 15% d'humidité, d'autres espèces peuvent apparaître telles que: *Aspergillus repens*, *Aspergillus amstelodami*, *Aspergillus ruberprédominant* et conservent leurs prédominances même à des teneurs d'humidité supérieures à 18% (Christensen et Kaufman, 1969).

I.5.2.2 Le genre *Penicillium*

Les moisissures de ce genre sont moins fréquentes avant la récolte mais commencent à croître rapidement pendant le stockage, quand les conditions appropriées sont réunies. Elles se développent même lorsque la teneur en eau est relativement basse, mais elle doit être

au-dessus d'un seuil de 14% environ et d'un taux d'humidité de 75% (Boudreau et Ménard, 1992).

Les espèces les plus communes sont essentiellement : *Penicillium aurantiogriseum*, *Penicillium cyclopium*, *Penicillium hordei*, *Penicillium freii*, *Penicillium melanoconidium*, *Penicillium polonicum*, *Penicillium viridicatum*, *Penicillium verrucosum*, *Penicillium crustosum* (Dijksterhuis et Samson, 2007).

I.6. Isolement des moisissures

Le choix des milieux de culture est aussi déterminant dans l'isolement et le dénombrement de la microflore du produit à analyser. Trois catégories de milieux peuvent être distinguées : les milieux de routine, peu sélectifs, permettant l'isolement d'un grand nombre de moisissures ; les milieux sélectifs adaptés à la recherche d'une espèce ou d'un groupe d'espèces à écologie particulière et difficile à mettre en évidence avec un milieu ordinaire; les milieux différentiels utilisés pour la détermination de champignons appartenant le plus souvent à des genres difficiles (Tabuc, 2007).

I.7. Identification des moisissures

L'identification des très nombreuses espèces fongiques susceptibles de coloniser les aliments et d'en altérer les qualités, voire de produire des mycotoxines est une étape indispensable à l'évaluation du risque mycotoxique.

Cette identification a pendant longtemps été exclusivement basée sur l'observation des caractères cultureux et morphologiques de l'espèce. Les progrès récents de la biologie moléculaire ont permis de proposer des outils d'aide à l'identification. Toutefois, la complexité du règne fongique fait, qu'à l'heure actuelle, ces outils ne peuvent pas encore remplacer complètement l'examen morphologique, qui reste la base de l'identification (Tabuc, 2007).

Chapitre II: *Aspergillus Niger*

II.1. Généralités

L'*Aspergillus* est un champignon filamenteux (ou moisissure) qui se développe par un système de filaments ou hyphes présent dans les moisissures, L'*aspergillus* se retrouve dans le sol, les céréales, les aliments et le compost en décomposition (**Samson et Varga, 2007**).

Certaines espèces peuvent être directement pathogènes pour l'homme et les animaux en étant capable d'envahir les tissus vivants et provoquer des aspergilloses, *Aspergillus fumigatus* responsable de mycoses pulmonaires ; *Aspergillus niger* responsable d'aspergillose du conduit auditif (**Morin et al., 1994**).

Aspergillus niger, en tant que l'une des plus importantes espèces de champignons fongiques filamenteux, est utilisé en biotechnologie et est également l'un des champignons de contamination naturelle les plus répandus dans les aliments pour animaux et denrées alimentaires (**Morin et al., 1994**).

II.2. Définition

L'*Aspergillus niger* ou l'*aspergille noir*, est un champignon cosmopolite, filamenteux ascomycète de l'ordre des eurotiales. C'est une des espèces les plus communes du genre *Aspergillus* qui apparaît sous forme d'une moisissure de couleur noire sur les fruits et légumes.

Il est largement répandu dans le monde qui possède la capacité de se développer dans une vaste gamme de substrats. Est un espèce qui peut provoquer une détérioration des aliments, et aussi utilisées dans les industries de fermentation pour produire des acides organiques (acides citrique et gluconique), ainsi que des enzymes hydrolytiques (lipases et les amylases) (**Daiani et al., 2011**).

II.3. Les facteurs déterminants

Est une espèce thermopréférante et osmopréférante (**Dijksterhuis et Wösten, 2013**).

Tableau II: Les paramètres de culture de l'espèce *A. niger* (**Dijksterhuis et Wösten, 2013**).

Température	pH	Activité de l'eau (Aw)
6 – 47 ° C	1,5 – 9,8	0,77 %

II.4. Taxonomie

En raison de son importance économique, *l'Aspergillus* est l'un des genres les mieux Décrits du point de vue taxonomique parmi les champignons filamenteux. Pour classer *Aspergillus niger* en prenant essentiellement les caractéristiques morphologiques en compte (Schuster *et al*, 2002).

Tableau III : La position systématique d'*Aspergillus niger* (Schuster *et al*, 2002).

Règne	Mycètes
Embranchement	Amastigomycota
Sous-embranchement	Deuteromycotina
Classe	Deutoromycètes
Ordre	Moniliales
Famille	Moniliaceae
Genre	<i>Aspergillus</i>
Espèce	<i>Aspergillus niger</i>

II.5. Les critères de classification

La classification d'*Aspergillus niger* est fondée sur les caractères morphologiques qui sont de deux types:

II.5.1 Macroscopique

Pour l'observation macroscopique des moisissures, il est nécessaire de caractérisé ces isolats sur milieu PDA par :

- **L'aspect des colonies** : qui représente un critère clef d'identification *Aspergillus niger* forment des colonies duveteuses, laineuses, poudreuses ou granuleuses.
- **La couleur des colonies** : c'est un élément très important d'identification. Les colonies d'*Aspergillus niger* sont blanches au début, puis jaunes, à maturité, elles deviennent noires. Le revers des colonies est incolore ou jaune pâle (Tabeuc, 2007).

II.5.2 Microscopique

La caractérisation microscopique d'*Aspergillus niger* est fondée essentiellement sur la forme et la taille des éléments constitutifs de l'organe reproducteur qui sont représentés par:

- ❖ Têtes conidiennes brun foncé à noires, radiées à l'état jeune puis se séparant en colonnes plus ou moins bien définies à maturité, et pouvant atteindre un diamètre de 700 à 800 μm .
- ❖ Les conidiophores sont à paroi lisse, de 1,5 à 3 mm de long, hyalin ou deviennent foncés vers la vésicule
- ❖ Vésicule globuleuse de 50 à 100 μm , supportant deux séries de stérigmates sur toute sa surface.
- ❖ Les phialides 7-9,5 x 3-4 μm étant portées par des mutules généralement brunes 20-30 x 5-6 μm , souvent septées.
- ❖ Les conidies sont globuleuses à sous-globuleuses (diamètre de 3,5 à 5,0 μm), brun foncé à noir et à paroi rugueuse (**Ruchi Sharma, 2012**).

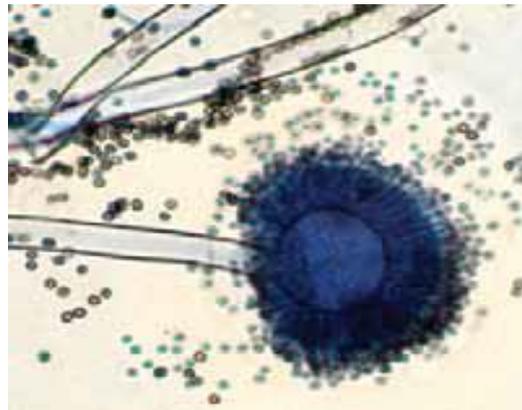


Figure 01 : *Aspergillus niger* sur microscope optique ($\times 40$) (**Tabeuc, 2007**).

II.6. Habitat

Aspergillus niger peuvent coloniser une grande variété de substrats. Il se trouve généralement sous forme de saprophyte poussant sur des feuilles mortes, du grain stocké, des tas de compost et toute autre végétation en décomposition. Les spores sont répandues et sont souvent associées à des matières organiques et à la terre. Cette espèce est aussi responsable de la carie après la récolte, par exemple, des mangues, des papayes, des ananas, des grenades, des pommes, des poires et des raisins. D'autres produits alimentaires tels que les oignons, le riz, le blé, le café, les noix et les graines de tournesol constituent également des substrats pour *A. niger* (**Ruchi Sharma, 2012**).

II.7. Mycotoxines

Au cours de la colonisation, *Aspergillus niger* peut produire des mycotoxines (métabolites secondaire), hépatocarcinogène et néphrogénique (**Ruchi Sharma, 2012**), ces

mycotoxines sont: L'ochratoxine A et les fumonisines, principalement des fumonisines B2 (Dijksterhuis et Wösten, 2013).

Les fumonisines sont soupçonnées de provoquer des toxicoses tant chez l'homme que chez les animaux et sont considérées comme cancérigènes. Parmi les sept fumonisines actuellement identifiées, les fumonisines B1 (FB1), B2 (FB2) et B3 (FB3). Des rapports montrent que la production de FB2 par ces espèces est plus élevée lorsqu'il grandit dans des milieux de culture à faible activité de l'eau (Aw). Les produits à faible Aw peuvent être plus susceptibles à la contamination par FB2.

La découverte de souches d'*Aspergillus niger* produisant de l'ochratoxine A (OTA) a suscité des préoccupations non seulement pour leur sécurité biotechnologique, mais également pour leur risque pour la sécurité des aliments, en raison de leur présence commune dans différents produits. L'ochratoxine A est retrouvée essentiellement dans les céréales issues des régions

Chaudes (blé, maïs, seigle, orge...), les produits dérivés des céréales (la farine, le pain, les pâtes et les aliments de mauvaises conditions de stockage.

L'OTA est une néphrotoxine puissante et possède des propriétés tératogènes, immunosuppressives et cancérogènes. Les céréales et bases de céréales, les denrées alimentaires sont les principaux contributeurs à la consommation d'OTA chez l'homme et les animaux (Sifou, 2016).

Tableau IV : Les mycotoxines produit par *Aspergillus niger* (Van der Merwe *et al.*,1965).

Mycotoxine	Propriété physico-chimique	Effet
Fumonisine	Faible activité de l'eau (aw)	Cancérigène. Hepatocarcinogène.
Ochratoxine A	Stable Température : 8 - 37°C Humidité faible : 0,86 pH : 2,2 – 10	Risque pour la sécurité alimentaire, Tératogène, immunosuppressives, cancérigène, néphrogénique

II.8. Les effets néfastes d'*Aspergillus niger*

Les grains de blé forment un excellent substrat pour les moisissures .Pendant le stockage et la récolte, il subit généralement la perte de qualité, qui est caractérisée par susceptibilité accrue à l'infection par les mycètes, les insectes et les acarides

Les mycètes causent beaucoup de genres de détérioration ou de dommages dans le grain. Ceux-ci incluent la diminution de la germination, la décoloration, les changements chimiques et alimentaires, le chauffage, le durcissement (**Bel Yagoubi, 2007**) et des mauvais goûts qui à comme conséquence le rejet du produit. L'activité fongique mène également aux pertes de matière sèche et de valeur nutritive Il y a aussi des problèmes de santé dus à la formation des mycotoxines et des spores allergéniques. Il y a aussi les modifications des propriétés rhéologiques (caractéristiques plastiques) des pâtes. Les moisissures et mycotoxines entraînent des problèmes pour les producteurs de volailles et bétails (performances réduites des animaux et diminution de la reproduction, pertes dues aux maladies).

Des analyses mycologiques effectuées sur des échantillons de café vert montrent une contamination importante par des espèces d'*Aspergillus niger* (83,3% des échantillons) (**Cristina.T, 2007**).

Chapitre III: *Schinus molle*

III.1. Définition

Schinus molle est connu sous le nom de poivre américain, poivre du Pérou, escobilla, faux poivron. Un arbre court a de longues feuilles minces, il est souvent utilisé dans les climats subtropicaux pour l'aménagement paysager (Mehani et Segni, 2013).

C'est une plante médicinale utilisée en thérapie traditionnelle. Les huiles essentielles de cette plante ont de nombreuses propriétés thérapeutiques. Ils sont utilisés traditionnellement comme agent cicatrisant, stomacal et antidiarrhéique, en raison de la présence de tanins et de résines grasses (Rocha *et al.*, 2012).

En phytothérapie, ils sont utilisés pour leurs propriétés antiseptiques contre les maladies infectieuses d'origine fongique, contre les dermatophytes, celles d'origine bactérienne (Mehani et Segni, 2013). De nombreuses propriétés médicinales ont été attribuées à cette plante (Simionatto *et al.*, 2011). Des recherches récentes montrent que des extraits obtenus de *Schinus molle* peuvent être utilisés en tant qu'agent analgésique (anti-douleur), anti-inflammatoire et anti-tumoral. Il possède également des propriétés antibactériennes, antivirales, antifongiques, insecticides et répulsives (Devecil *et al.*, 2010).

III.2. Classification

Tableau V : Classification botanique de *Schinus molle* (Madhu et Bikshal, 2012).

Régne	Plantae
Sous-régne	Tracheobionta
Division	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Sous-classe	Rosidae
Ordre	Sapindales
Famille	Anacardiaceae
Genre	Schinus
Espèce	<i>Molle</i>

III.3. Description botanique

Noms locaux: Arabe (felfel-kazib); Anglais (poivrier, Poivrier de Californie, poivrier chilien, arbre à mastic, molle, baies poivrées, pleurantpoivre, mastic péruvien, poivre rose, Poivrier péruvien); Français (faux Poivrier du Pérou, poivre rosé) (Madhu et Bikshal, 2012).

III.4. Caractères généraux

Arbre à feuilles persistantes au feuillage pleurant, 6-8 mois, sur de bons emplacements jusqu'à 15 m; tronc court d'écorce brun foncé, profondément fissuré et écaillé, dégageant un latex collant lorsqu'il est endommagé. Feuilles composées, 15-30 cm de long, avec 15-41 folioles; folioles vert jaunâtre, de 2 à 5 cm de long, lancéolées, à marges entières ou dentelées. Les feuilles ont une odeur de poivre lorsqu'elles sont broyées. Les fleurs sont unisexuées, petites et jaune pâle, en panicules de 10-15 cm de long. Les fleurs femelles et les fleurs mâles se trouvant normalement sur différents arbres, dans la zone de répartition naturelle, la floraison a lieu de septembre à décembre et les fruits sont mûrs de décembre à janvier. En Afrique de l'Est, les fruits sont récoltés en mars. Tous les fruits ne mûrissent pas en même temps et au sein d'une grappe, ils sont souvent à différents stades de maturité. Les fruits sont de petites drupes rondes, de 5 à 9 mm de diamètre, rouge vif à maturité et noirâtres. La pulpe est fine et coriace; Il a un goût sucré et contient des huiles aromatiques. Il y a une ou deux graines par fruit. Les graines ont un diamètre de 2 à 4 mm, rondes, brun-noir, sillonné une fois sec. Il y a 30 000 à 40 000 graines par kg (Madhu et Bikshal, 2012).



a – Les feuilles

b - Les fruits

c - Le tronc

figure 02 : *Schinus molle* (Madhu et Bikshal, 2012).

III.5. Distribution et habitat

Schinus molle est largement cultivé dans les régions tropicales et subtropicales (**Rocha et al, 2012**). Il est largement répandu en dehors de leurs gammes géographiques originales, grandit au nord et Amérique centrale, Afrique, Moyen-Orient et est cultivé autour de la Méditerranée dans Europe du Sud. En Argentine, il est largement utilisé comme un arbre urbain en raison de sa résistance à la pollution, diffusion facile et économique et peu besoin d'irrigation.

La zone de distribution naturelle est les Andes région, principalement le Pérou. On le trouve à des altitudes à 3900 m d'altitude, dans les zones de 300-700 mm pluie / ans. Il tolère les températures élevées et une fois établi, il est extrêmement sec résistant. Une espèce pionnière à croissance rapide qui est généralement trouvé en bordure de route et sur Les terres agricoles. Préfère les sols sableux et bien drainés mais ils tolèrent à la plupart des types de sol et aussi à salinité et alcalinité. Introduit à Central et Amérique du Nord, Europe et Afrique et dans certains endroits, il a été naturalisé (**Madhu et Bikshal, 2012**).

III.6. Huile essentielle

Les huiles essentielles sont des composés volatils naturels et complexes, caractérisés par une forte odeur, généralement solubles dans les solvants organiques de densité inférieure à celle de l'eau (**Rocha et al, 2012**). Les huiles essentielles, constituants du métabolisme secondaire des plantes, ne sont pas toujours présentes chez tous les végétaux. Elles se localisent dans toutes les parties vivantes de la plante, aussi bien dans les fleurs, les feuilles, les fruits, les tiges que dans les écorces, les graines, les racines, les rhizomes ou le bois. Elles se forment dans des cellules spécialisées, le plus souvent, regroupées en poches ou en canaux sécréteurs et elles sont ensuite transportées lors de la croissance de la plante dans d'autres parties (**Madhu et Bikshal, 2012**).

III.6.1. Composition chimique des huiles essentielles

La composition chimique des huiles essentielles est très complexe d'un double point de vue, à la fois par le nombre élevé de constituants présents et surtout par la diversité considérable de leurs structures. Elle peut varier selon l'organe, l'origine géographique et botanique, la localisation des sites producteurs, les facteurs climatiques, la nature du sol, les pratiques culturales, le procédé et les conditions d'extraction, ainsi que la conservation (séchage et stockage) .

Des études comparative de la composition chimique et de l'activité biologique de l'huile essentielle des feuilles *Schinus molle* extraite par hydro-distillation et par micro-ondes présentent q'elle se compose principalement d'hydrocarbures monoterpènes (par exemple, le-pinène, le-pinène, le sabinène, le terpinène-4-ol...) et de certains sesquiterpènes tels que spathulénol et le germacène-D (**Rocha et al, 2012**).

Il existe plusieurs rapports sur l'activité insecticide et antimoustique des huiles essentielles de *S. molle*. Environ 60% des huiles essentielles ont une activité antifongique et 35% ont des propriétés antibactériennes. Les huiles essentielles agissent contre les micro-organismes, causant souvent une instabilité de la membrane plasmique, entraînant une lyse cellulaire. Bien que l'activité antimicrobienne puisse être déclenchée par un composé chimique unique, elle semble généralement résulter d'une synergie entre plusieurs substances chimiques présentes dans l'huile. L'activité inhérente d'une huile peut être liée à sa composition chimique, aux proportions des composants et aux interactions entre eux (**Rocha et al, 2012**).

III.7. Caractère toxique de la plante

Les suspensions de petites baies roses de cet arbre d'ornement attrayant sont réputées pour être modérément toxique, en particulier le graine. Le pollen, par contact ou par inhalation, peut provoquer une dermatite et des réactions asthmatiques. L'arbre a également antimicrobien, antifongique, propriétés piscicides et viricides.

L'exposition cutanée aiguë d'extraits éthanoliques et hexaniques de feuilles de *Schinus molle* ne provoque qu'une irritation cutanée légère et réversible, ainsi qu'un léger effet stimulant chez le rat. Tous ces éléments indiquent que l'utilisation topique de ces extraits serait sans danger (**Madhu et Bikshal, 2012**).

Chapitre I : Etude mycologique du blé stocké non traité

La microflore et particulièrement les moisissures constituent en cours de stockage, la cause principale d'altérations diverses et par la suite de pertes inestimables. Ce sont surtout les *Aspergillus* et les *Penicillium*, hôtes normaux et habituels des grains qui sont susceptibles de se développer abondamment au cours de stockage défectueux (**Gacem, 2011**).

IV.1.1. Echantillonnage

Les analyses effectuées ont portés sur les grains de blé dur non traités, stockés depuis trois ans qui nous ont été fournis par une ferme d'Ain Belomrane, la wilaya de Bordj Bou Arreridj. Les échantillons ont été transportés au laboratoire de Microbiologie dans des sacs stériles en papier.



Photographie 01 : l'échantillon de blé.

IV.1.2. Préparation du milieu de culture

Le milieu de culture PDA (potatoe dextrose agar) (**annexe**) est le milieu favorable pour la croissance des champignons phytopathogènes (**Fabrice, 2010**).

IV.1.3. Isolement et identification des moisissures

L'isolement des moisissures a été réalisé sur le milieu PDA additionné de Gentamicine, jugé comme milieu de choix pour l'isolement des moisissures. Les boîtes sont incubées dans l'étuve à 25°C, pendant 4 à 7 jours jusqu'à apparition des champignons.

L'identification des champignons est fondée principalement sur des critères morphologiques liés aux modes de reproduction (**Gacem, 2011**).

IV.1.3.1.. Désinfection des échantillons

Avant la mise en culture, les échantillons sont d'abord lavés à l'eau courante. Ensuite, les grains de blé dur a été désinfectés superficiellement par trempage dans une solution diluée d'hypochlorite de sodium à 1% (eau de Javel) pendant 3 à 4 min pour chaque échantillon. Les grains ont été ensuite rincés trois fois à l'eau distillée stérile afin d'éliminer toute trace d'hypochlorite de sodium (**Gacem, 2011**).

IV.1.3.2. Séchage de l'échantillon

Le séchage se fait à température ambiante devant le bec bunsen. On dépose les grains sur un papier filtre stérile pendant quelques minutes jusqu'à séchage total des grains (**Gacem, 2011**).

IV.1.3.3. Broyage de l'échantillon

L'échantillon bien sécher doit être broyer avec un mortier et pilon stérile devant le bec bunsen (**Gacem, 2011**).

IV.1.3.4. Isolement des moisissures

La méthode que nous avons adopté est celle des dilutions décimales (ou méthode indirecte). Elle consiste à dénombrer les micro-organismes des grains de blé.

- De chaque échantillon, 5g de grains broyés ont été additionnés à 45ml d'eau physiologique, ce qui correspond à la solution mère (50ml).

- A partir de cette solution, des dilutions décimales ont été réalisées pour chaque échantillon de blé.

-Deux boites pour chaque dilution ont étéensemencées avec 0.1 ml d'inoculum étalé en surface.

-L'incubation a été faite à $25 \pm 2^\circ\text{C}$ pendant 5 à 7 jours. Le développement bactérien a été inhibé par l'adjonction d'antibiotiques (Gentamicine) (**Gacem, 2011**).

IV.1.4. Purification des isolats

Des observations quotidiennes ont été effectuées dès la germination des spores et l'apparition de mycéliums. Chaque type de mycélium a été repiqué, à l'aide d'une anse de platine stérile, au centre de boite de Pétri contenant un milieu PDA, puis incubé à $28 \pm 4^\circ\text{C}$ pendant 6 jours.

En cas de contamination par une autre souche fongique, la purification des souches a été effectuée par le repiquage d'une hyphe terminale au centre d'une boite contenant le même milieu et dans les mêmes conditions d'incubation jusqu'à l'obtention de souches pures (**Djermoun, 2009**).

IV.1.5. Identification des isolats

L'identification des champignons contaminants les grains de blé repose sur :

IV.1.5.1. Etude des caractères cultureux

L'étude des caractères morphologiques macroscopiques a porté sur tous les groupes de moisissures isolées. Les caractères étudiés sont:

- ➤ □ Au niveau du mycélium : la couleur et la texture du thalle, la couleur du revers de la colonie, le contour de la colonie et la vitesse de croissance apicale
- ➤ □ Au niveau des spores : la densité sur le thalle, l'aspect des spores (granuleux, poudreux), l'uniformité de la couleur des spores, la présence de pigment diffusible et les exsudats (**Tabeuc, 2007**).

IV. 1.5.2. Etude des caractères morphologique microscopique

L'examen microscopique d'une colonie fongique se fait après réalisation:

- d'un étalement du colorant bleu de méthylène sur lame.
- la prise d'une colonie fongique avec un scotch.
- étalement sur lame.

Généralement, un examen à l'objectif 40 est suffisant pour mettre en évidence la plupart des éléments importants.

Ce type d'identification est fondé essentiellement sur l'étude morphologique du mycélium (Absence ou présence de cloisons, couleur, mode de ramification, différenciation des thallospores,..) et des spores (forme, couleur, texture des parois, groupement en chaînes, etc.) (**Botten et al., 1990**).

IV.1.6. La conservation

La souche *Aspergillus niger* a été repiquée sur un milieu PDA et conservée à 4°C (**Erit, 1987**).

Chapitre II: Etude de l'effet de l'huile essentielle des fruits de *Schinus molle* sur *Aspergillus niger*

Cette étude a nécessité deux étapes distinctes :

IV.2.1. Extraction de l'huile essentielle des fruits de *Schinus molle*

IV.2.1.1. Matériel végétal:

Les fruits mûrs de l'arbre *Schinus molle* sont récoltés en mars 2019 à Bordj Bou Arreridj



Photographie 02: les fruits de l'arbre *Schinus molle*

IV.2.1.2. Méthode d'extraction, l'hydrodistillation

L'hydrodistillation consiste à immerger directement le matériel végétal à traiter (avec ou sans traitement mécanique préalable) dans un réacteur rempli d'eau qui est ensuite portée à ébullition. Les vapeurs qui constituent un équilibre hétérogène (eau et composés organiques) sont condensées sur une surface froide (condensateur) et l'huile essentielle se sépare par différence de densité dans un essencier de la phase aqueuse ou hydrolat. On récupère l'huile essentielle généralement moins dense que l'eau (**Labiod R. 2016**).



Photographie 03: Dispositif d'extraction des huiles essentielles de type Clevenger.

IV.2.2. Essai de l'évaluation de l'activité de l'huile essentielle sur *Aspergillus niger*

Afin de tester le pouvoir antifongique de huile essentielle des fruits de l'arbre *Schinus molle* sur *Aspergillus niger*, nous avons utilisé une seule méthode. On prépare premièrement l'inoculum: les spores d'*Aspergillus niger* seront posés dans un tube à essai contenant l'eau physiologique stérile (**Guezlane et al., 2018**).

IV.2.2.1. Méthode d'ensemencement en touche (en spot)

La méthode utilisée est celle d'ensemencement en spot où l'huile essentielle des fruits de l'arbre *Schinus molle* est testée avec des concentrations de milieu PDA.

Ces concentrations sont obtenues par l'addition de 10, 20, 40, 60, 80, 100 et 120 µl d'huile essentielle à 20ml du milieu PDA tiède dans un tube à essai. Après agitation des tubes, le milieu est coulé dans des boîtes de Pétri.

L'inoculation se fait par l'ensemencement des spores d'*Aspergillus niger* au centre des boîtes de pétri à l'aide d'une anse de platine.

Une boîte de Pétri contenant 20ml de milieu PDA, sans huile essentielle, est inoculée pour servir de témoin.

Deux répétitions ont été réalisées au cours de cet essai.

Après incubation à 28°C pendant 7 jours en tenant compte de la croissance du témoin (**Guezlane et al., 2018**).

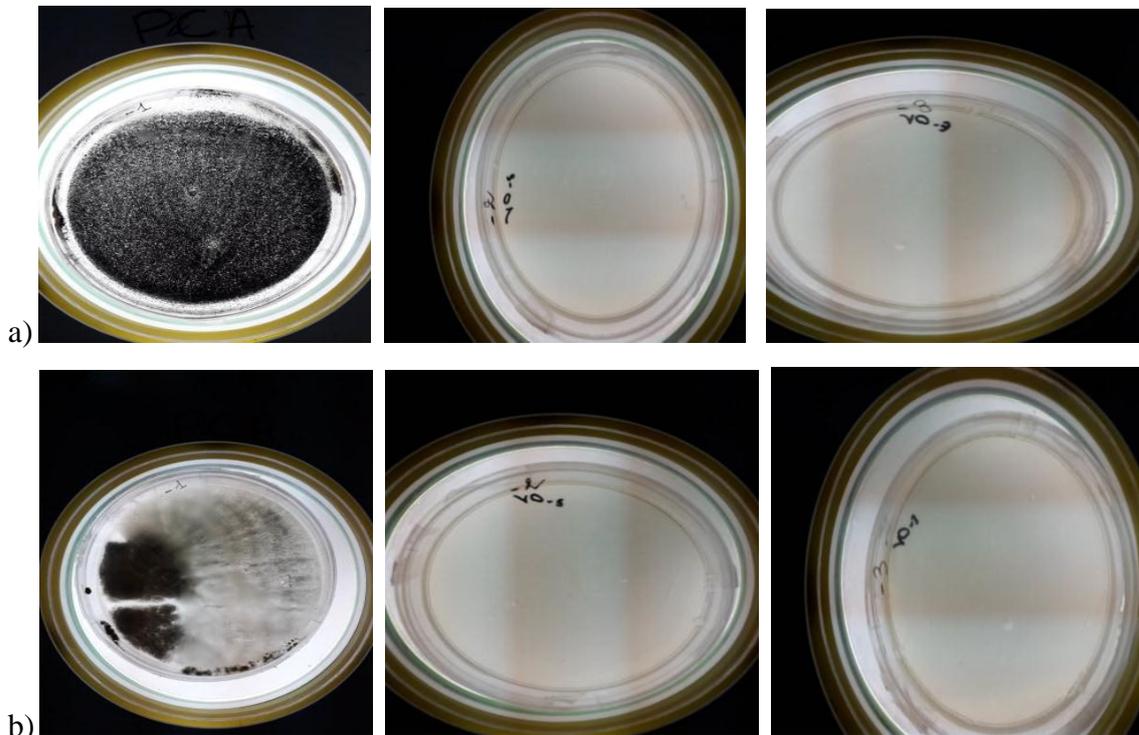
Résultats

Et discussion

V.1. Les résultats

V.1.1. Etude mycologique des grains de blé stocké non traités

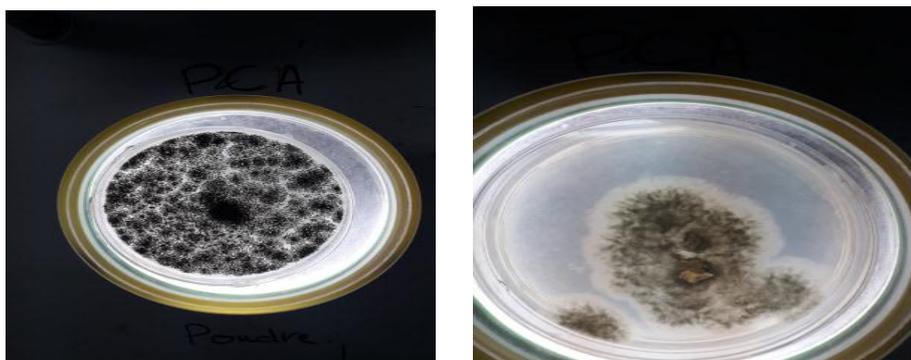
Après l'incubation des grains de blé stockés non traités,ensemencés sur le milieu PDA à $28\pm 4^{\circ}\text{C}$ pendant 7 jours, nous avons observé l'apparition de deux types de colonies : l'une des colonies de couleur vert - bleuâtre et l'autre des colonies duveteuses, laineuses, poudreuses ou granuleuses. . Les photographies



Photographie 04: a) Colonies d'*Aspergillus niger*. b) Colonies de *Penicillium* Sp. des grains de blé stockés non traités.

V.1.2. Purification des isolats

Après le repiquage dans des boites contenant le même milieu et placées sous les mêmes conditions d'incubation, nous avons vu apparaitre des souches pures. Ces dernières sont bien visibles au niveau des boites de Pétri, représentées par les photographies ci-dessous.



Photographie 05: L'obtention des souches pures après plusieurs repiquages.

V.1.3. Identification macroscopique

L'espèce *Penicillium* sp. des colonies de couleur vert - bleuâtre (la couleur des phialides) et un aspect velouté selon (Pitt and Hoking, 1991).



Photographie 06: Colonies de *Penicillium* sp.

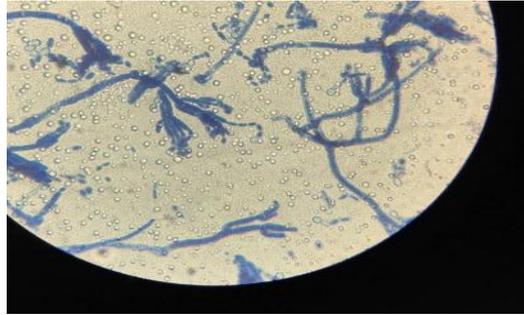
L'espèce d'*Aspergillus niger* forme des colonies duveteuses, laineuses, poudreuses ou granuleuses. Qui apparaissent blanches au début de la croissance, puis jaunes, et à maturité deviennent noires. Le revers des de ces colonies est incolore ou jaune pale, comme l'avait décrit (Botton et al., 1990).



Photographie 07: colonies d'*Aspergillus niger*

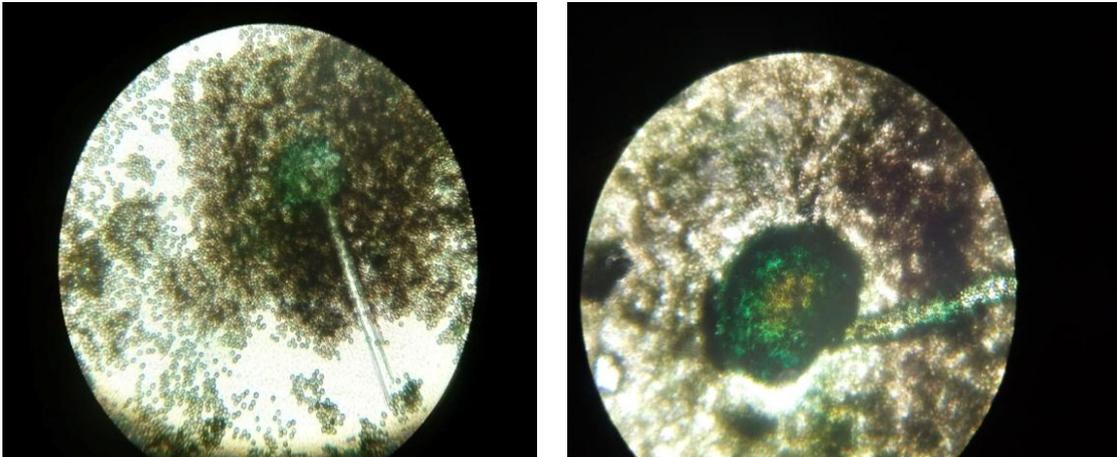
V.1.4. Identification microscopique

Les caractéristiques microscopiques de *Penicillium* sp. sont les suivants: le thalle formé de filaments mycéliens septés et hyalins, porte des conidiophores lisses ou granuleux, simples ou ramifiés. Les conidiophores sont septés et groupés en faisceaux lâches ou agrégés en corémies bien individualisés.



Microphotographie 08: *Penicillium* sp. au grossissement X40.

D'après la clé d'identification de (**Botton et al., 1990**), l'isolat est classé dans l'espèce *Aspergillus niger*. Cette espèce possède un thalle à croissance rapide, avec comme caractère microscopique la présence d'un mycélium cloisonné et des vésicules globuleuses avec conidies globuleuses, parfois légèrement aplaties, brunes, échinuleuses et verruqueuses.



Microphotographie 09: Spores et tête d'*Aspergillus niger* au grossissement X40.

V.1.5. Etude de l'activité antifongique de l'extrait des fruits de l'arbre *Schinus molle*

Le résultat obtenu par la méthode extraction par hydrodistillation est:

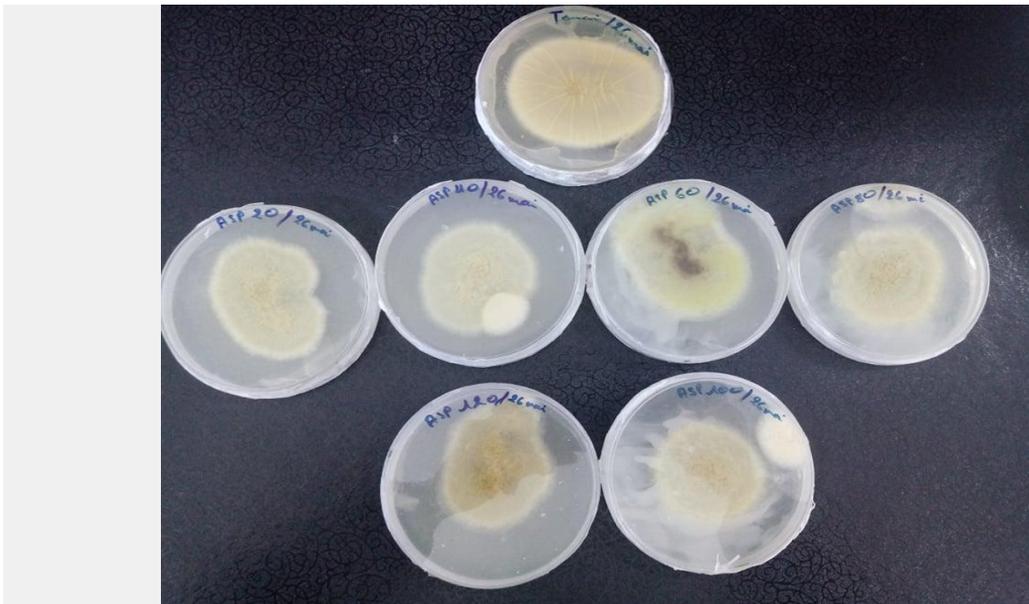


Photographie 10: l'huile des fruit de l'arbre *Schinus Molle*.

NB : le choix de tester l'activité antifongique de l'extrait des fruits de l'arbre *Shinus molle* vis-à-vis l'espèce *Aspergillus niger* est basé sur:

- L'espèce est identifiée.
- Son association à diverses maladies des plantes.
- Son effet néfaste vis-à-vis le blé.

Les résultats obtenus par La méthode d'ensemencement en touche (en spot) au 7ème jour sont les suivantes:



Photographie 11: les colonies des résultats de septième jour.

Tableau VI : les diamètres des colonies aux septième jour.

Les concentrations de l'extrait dans 20 ml de PDA	20	40	60	80	100	120	Témoin
Le diamètre des colonies Du 1 ^{er} répétition	4,5	3,5	3,2	3,4	3	2,6	6,5
Le diamètre des colonies Du 2 ^{em} répétition	0,5	3	2,5	3,5	1	3	6,5

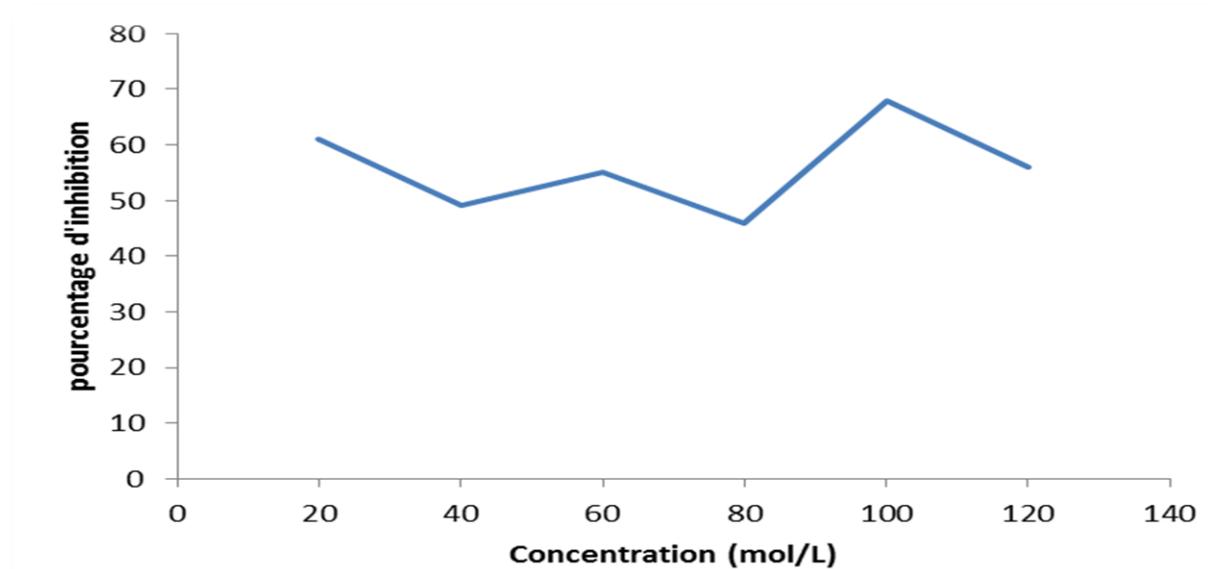
V.1.5.1. Calcule des pourcentages d'inhibition

On calcule les pourcentages d'inhibition par l'équation suivant:

(Le diamètre de témoin – le diamètre de chaque concentration) / Le diamètre de témoin x 100

Puis la calcule de la moyenne des deux répétitions

Expression du pourcentage d'inhibition par une courbe



Graphique 1: Courbe d'inhibition de l'huile essentielle de *Schinus molle* vis-à-vis d'*Aspergillus niger*.

V. 2. Discussion

Dans notre étude, nous avons choisi d'isoler les souches fongiques contenues dans les grains de blé dur non traités et stockés pendant 3 ans, sur le milieu PDA (potatooe dextrose agar) qui est un milieu organique à base de jus de pomme de terre et d'agar, ce qui favorise la sporulation des moisissures ; à ce milieu, un antibiotique (Gentamicine) est ajouté pour inhiber le développement des bactéries.

Nous avons obtenu une charge fongique élevée, associée au blé dur stocké ,non traité ; cette flore fongique appartient à la flore du champ ,constituée essentiellement de deux genres : *Aspergillus* et *Penicillium*. Ceci est conforme avec les données bibliographiques (**Botton et al., 1990**) avec une prédominance de l'espèce *Aspergillus niger* par rapport aux autres espèces. Cette espèce est naturellement présente dans le sol (**Samson et Varga, 2007**).

La présence du genre *Aspergillus* dans la flore de contamination des céréales est signalée dans plusieurs travaux. Ainsi, les espèces du genre *Aspergillus* sont considérées comme des moisissures de stockage. Cette fréquence de contamination importante est

accompagnée aussi par une production de mycotoxines. Si cette présence de flore fongique est surprenante, ce n'est pas la première fois qu'une telle contamination est observée. En effet, des enquêtes récentes menées en Italie, rapportent la présence de flore productrice de mycotoxines dans les certaines matières premières et aliments (**Pietrie et al., 2004**).

Concernant le pouvoir antifongique, l'analyse des résultats obtenus par la méthode d'ensemencement en touche (en spot) relatifs à la croissance des moisissures soumises à l'action de différentes concentrations de l'huile essentielle des fruits de l'arbre *Schinus molle* testée pour son activité inhibitrice vis-à-vis d'*Aspergillus niger*, nous a permis de déterminer le pourcentage d'inhibition.

L'examen de la nature de cette activité révèle qu'il s'agit d'une activité fongistatique très faible puisque la croissance de champignon testé a repris sur le milieu PDA contenant l'huile essentielle.

L'activité fongistatique de l'huile essentielle des fruits de *Schinus molle* que nous avons observé pourrait être liée soit:

- Aux faibles concentrations de l'huile essentielle que nous avons testées
- Ou bien à la résistance d'*Aspergillus niger* vis-à-vis de cette huile qui pourrait être expliqué par la présence des enzymes hydrolytiques au niveau de la paroi.

VI. Conclusion et perspective

Notre travail a été réalisé au laboratoire de Microbiologie, département des Sciences Biologiques de l'université -Mohamed El Bachir El Ibrahimi- de Bodj Bou Arréridj . Il a porté principalement sur 2 axes:

1 - Isoler, purifier et identifier des différentes souches de champignons à partir du blé dur stocké non traité.

2-Tester l'activité inhibitrice de l'huile essentielle des fruits de l'arbre *Schinus molle* vis-à-vis d'*Aspergillus niger*.

Les résultats des expériences menées au laboratoire ont permis d'isoler et de purifier 2 espèces de moisissures présentes dans le blé dur stocké pendant 3ans à savoir: *Penicillium* Sp.et *Aspergillus niger*.

L'analyse des résultats obtenus par la méthode d'ensemencement en touche (en spot) relatifs à la croissance du champignon soumises à l'action de différentes concentrations de l'huile essentielle des fruits de l'arbre *Schinus molle* et les calculs du pourcentage d'inhibition ont montré que cette huile essentielle a une faible activité fongistatique vis-à-vis *Aspergillus niger*.

En perspective, nous proposons que des concentrations plus importantes de cette huile soient testées.

Annexe

Le milieu de culture PDA (potatoe dextrose agar)

Composition :

- 200 g de Pomme de terre ;
- 15 g de Dextrose ou de sucre blanc de cannes ;
- 20 g d'agar - agar, gélose ou de gélatine ;
- 1 litre d'eau distillée.

Préparation :

1. Faire dissoudre 20g d'agar-agar dans 300 ml d'eau distillée, homogénéiser la solution.
2. Peser 200g de pomme de terre,
3. Eplucher et découper la pomme de terre en petits dés.
4. Faire bouillir la pomme de terre dans 300 ml d'eau distillée à 100° C pendant 20 à 25 minutes, ensuite recueillir le filtrat de la pomme de terre dont le volume est environ de 300 ml.
5. Ajouter au filtrat les 300 ml de la solution agar - agar.
6. Compléter le volume du mélange par de l'eau distillée jusqu'à 1000 ml.
7. Auto claver le mélange à une température de 125° C, sous une la pression de 1,4 bar pendant 15 minutes.
6. Sous hotte à flux laminaire, faire couler la solution obtenue dans des boîtes de Pétri.
7. Laisser sécher pendant 24 à 48 heures (**Fabrice, 2010**).

Références bibliographiques

- Abarca L.M., Francesc A., Jose C. et Cabanes J.F. (2004).** Taxonomy and significance of black *aspergillus*. Antoni van Leeuwenhoek Kluwer. Academic Publisher. 86: 33-49
- Alessandra M B. (2008).** Grande Guide Des Huiles Essentielles Santé Beauté Bien-Etre.Hachette pratique France : 205 pp.
- Bourgeois C.M., Mescle J.F., Zucca J. (1989).** Microbiologie alimentaire. Aspect microbiologique de la sécurité et de la qualité des aliments. Lavoisier. Paris. P : 216-244.
- Botton B., Breton A., Febre M., Goutier S., Gay Pl., Larent J., Reymont P., Sanglier J. J., Vayssier Y., Veau P. (1990).** Moisissure utile et nuisibles, importance industrielles 2eme édition. P: 419.35.
- Bel Yagoubi L. (2007).** Effet de quelques essences végétales sur la croissance des moisissures de détérioration des céréales. Thèse Magister. Univ.Abou Bekr Blkaid, Tlemcen : 1-75 pp + Annex I-IV.
- Bel Houcine F.Z. (2013).** Aspects radiologiques de l'aspergillose pulmonaire .Thèse Doct. Univ.Sidi Mohammed Ben Abdellah, Fés:141 pp.
- Boudreau A et Méncard G. (1992).** Le blé : Eléments fondamentaux et transformation. Presses de l'Université Laval, Paris : 439 pp .
- Christensen C.M. et Kaufmann H. H. (1969).** Grain storage. The role of fungi in quality loss. Minnesota archive Editions,153 pp.
- Daiani M. Silva1., Luis R. Batista; Elisângela F. Rezende 2; Maria Helena P. Fungaro 3; Sartori D., Alves E. (2011),** Identification of fungi of the genus *Aspergillus* section Nigiti using polyphasic taxonomy. Brazilian Journal of Microbiology, 42: 761-773.
- Deveci O., Sukan A.,Tuzun N., Kocabas E.E.H. (2010).** Chemical composition, repellent and antimicrobial activity of *Schinus molle* L. *Journal of Medicinal Plants Research*, 4: 2211-2216.
- Dijksterhuis J et Samson R. A. (2007).** Food mycology. A multifaceted Approach to fungi and food. CRC Press : 403 pp.
- Dijksterhuis J. et Wösten H. (2013).** Development of *Aspergillus niger* .Studies in Mycology. An institute of the Royal Netherlands Academy of Arts and Sciences : 1-29 pp.
- Djermoun A. (2009)** La production céréalière en Algérie : les principales caractéristiques, Revue Nature et Technologie, N°1 : 45-53.
- Druvefors U.A. (2004).** Yeast Biocontrol of Grain Spoilage Moulds Mode of Action of *Pichia anomala* Doctoral thesis. University of Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden, Department of Microbiology. Agraria: 44 pp.
- Erit O (1987).** Croissance de sur milieu solide: Importance de l'eau et de l'activité de l'eau.

Références bibliographiques

- Fabrice M. (2010).** Etude de l'efficacité des extraits de *Curcuma longo*, *Tihonia diversifolia* et de *Zingiber officinale* sur les micro-organismes de l'air. Cas de l'*Aspergillus flavus* et *Aspergillus niger*. Mémoire Institut supérieur agro- vétérinaire de Kimwenza RDC.
- Feillet P. (2000).** Le grain de blé : Composition et utilisation. Edition Quae. INRA, Paris : 308 pp.
- Gacem M. A. (2011).** Contribution à l'étude de l'activité antifongique et antimycotoxinogène des extraits méthanolique et aqueux des graines de *Citrullus colocynthis* sur la croissance de quelque moisissure d'altération de blé tendre stocké. Thèse Magister. Univ. Kasdi Merbah, Ouargla. 87 pp + Annexes.
- Gacem M.A., Ould El Hadj K.A., Gacemi B. (2011).** Étude de la qualité physicochimique et mycologique du blé tendre local et importé stocké au niveau de l'office algérien interprofessionnel des céréales (OAIC) de la localité de Saida (Algérie). *Algerian Journal of Arid And Environmen*, 1 : 67-76.
- Guezlane N. T., B. Kahlouche., S. Athmani-Guemouri. (2015).** Microbiologie travaux pratique. Office des publicaton unnivairsitaire. Alger : 140 pp.
- Iponga D.M. (2009).** Invasive potential of the Peruvian pepper tree (*Schinus molle*) in South Africa. Thesis Doct. Univ. Stellenbosch , 213 pp.
- Jarai G. et Buxton F. (1994).** Nitrogen, carbon and pH regulation of extracellular acidic protease of *Aspergillus niger*. *Current Genetics*. 26: 238-244.
- Labiod R. (2016)** Valorisation des huiles essentielles et des extraits de *Satureja calamintha nepeta* : activité antibactérienne, activité antioxydante et activité fongicide. (Doctoral dissertation).
- Leghlimi H. (2013).** Cellulase de souches fongiques issue du sol d'un milieu extrême (sol proche de sources thermales). Sélection des souches et étude des caractéristiques des enzymes. Tése Magister. **Univ. Costantine 1**, p:1-134.
- Madhu Babu et Bikshal Babu K (2012)** .A review on Brazilian pepper plant : *Schinus molle*. *Journal of Atoms and Molecules*, 2 : 6–13.
- Magan N., Hope C.V., Aldred D. (2003).** Post – harvest fungal ecology : Impact of fungal growth and mycotoxin accumulation in stored grain. *Euro Journal of Plant Pathology*. Kluwer Academic Pub., 109 : 723-730.
- Mathew S ., Thomas G., Tufail A. (2011).** An Evaluation of the fungi isolated from sub-epidermal region of post-harvested stored wheat grains. *Nepal Journal of Biotechnology*. 1: 9-13.
- Mehani M. et Segni L. (2013)** Antimicrobial effect of essential oil of plant *Schinus molle* on some bacteria pathogens. *International Journal of Bioengineering and Life Sciences*. 7: 1036-8.
- Meghazi N. (2015).** Activité antifongique de quelques huiles essentielles sur les moisissures du blé stocké. Thèse Magister. Univ. Ecole Nationale Supérieure Agronomique, Alger. 99 pp.
- Morin, A., Raymond, Y. et Cormier, F. (1994).** Production of fatty-acid ethyl-esters By *Pseudomonas fragi* under conditions of gas stripping. *Process Biochemistry*, 29:437-441.
- Molinie A., Faucet V., Castegnaro M., Pfohl-Leskowicz A. (2005).** Analysis of some breakfast cereals on the French market for their contents of ochratoxin A, citrinin and fumonisin B₁: development of a method for simultaneous extraction of ochratoxin A and citrinin. *Food Chemistry*. 92: 391-400.

Références bibliographiques

MULTON, J.L., (1982). Conservation et Stockage Des Grains et Graines et Produits Derivés- Céréales, oléagineux, protéagineux, aliments pour animaux. Technique & Documentation Lavoisier, Paris : 576 pp.

Nicklin J., Graeme-Cook K., Paget T and Killington R.(2000). L'essentiel en microbiologie. Edition Berti, p: 210-217.

Pietri A., Bertuzzi T., Pallaroni L., and Piva G. (2004) Occurrence of mycotoxins and ergosterol in maizeharvested over 5 years in northernItaly. *Food Addit. Contam* 21: 479 - 487.

Pitt J.I. and Hocking A.D. (1991) Significance of fungi in storedproducts, Proceedings of an international conferenceheld at Bangkok, Thailand : Fungi and mycotoxins in storedproduct, 16 - 21.

Rocha P.M., Rodilla J.M., David D., Elder H., Guala M.S., Lúcia A.S and Pombo E.B. (2012). Synergistic Antibacterial Activity of the Essential Oil of Aguariabay (*Schinus molle* L.). *Molecules*, 17: 12023-12036.

Roukas T. (2000). Citric and gluconic acid production from fig by *Aspergillus niger* using solid state fermentation. *Jornal of Inductrial Microbiology and Biotechnology.* 25: 298-304.

Ruchi Sharma. (2012). Pathogenicity of *Aspergillus niger* in plants. review article, *Cibtech Journal of Microbiology* (Online), 1 : 47-51.

Samson R.A. et Varga J. (2007). *Aspergillus* systematics in the genomicera. *Studies in Mycology.* 59: 71-73.

Simionatto E.,Chagas M.O., Peres M.T.L. P., Hess S.C., Cristiane B.D.S , Nilva Ré-Poppi., Gebara S., Corsino J., Morel A.F ., Stuker K..Z, Maria de Fátima C. Matos 4., João E. de Carvalho (2011). Chemical Composition and Biological Activities of Leaves Essential Oil From *Schinus molle* (Anacardiaceae). *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 14 : 37-41.

Sifou A. (2016). Validation d'une méthode analytique «*QuEChERS*» pour la détermination de l'Ochratoxine A (OTA) dans les aliments et etude de LA présence des mycotoxines émergentes dans le riz. Tése Doc. Univ. Mohammed V de Rabat, Maroc. 146 pp.

Soares C., Calado T., Venâncio A. (2013). Mycotoxin production by *Aspergillus niger* aggregate strains isolated from harvested maize in three Portuguese regions. *Article info*, 30 (1) : 9-13.

Schuster E., Dunn-Coleman N., Frisvad J.C. et Van Dijck P.W.M. (2002). On the safety of *Aspergillus niger* - a review. *Appl Microbiol Biotechnol.* 59: 426–435.

Tabuc C. (2007). Flore fongique de différents substrats et conditions optimales de production des mycotoxines, These doct. Univ .Toulouse : 190 pp.

Van der Merwe K. J., Steyn P. S., Fourie L., De Scott B., Theron J. J. (1965). Ochratoxin A, a toxic metabolite produced by *Aspergillus ochraceus* Wilh. *Nature.* 205: 1112-1113.

Wimalaratne P.,Slessor K., Borden J.,Chong L.,Abate T (1996). Isolation and identification of house fly, *Musca domestica* L., repellents from pepper tree, *Schinus molle* L. *Journal of Chemical Ecology*, 22 : 49-59.

Références bibliographiques

Waongo A., Yamkoulga M., Dabir-Binso C.L., Ba M.N., Sanon A. (2013). Conservation post-récolte des céréales en zone sud-saoudienne du Burkina Faso : Perception paysanne et évaluation des stocks, *Int. J. Biol. Chem. Sci*, 7 : 1157- 1167.

Yueqin Z, Recio M. C., Manez S., Giner R.M., Cerda-Nicolas M., Rios J.L. (2003). Isolation of two terpenoids and a bi flavanone with anti-inflammatory activity from *Schinus molle* fruits. *Planta Medica*, 69 : 893-898.

ملخص

يهدف العمل الحالي الى : معرفة وتحديد أنواع الفطريات الموجودة في القمح القاسي *triticum durum* المخزنة لمدة ثلاثة سنوات و التي توفرها مزرعة في عين بلعمران بولاية برج بوعرييج وتقييم نشاط الزيوت العطرية الأساسية المستخلصة من ثمار شجرة *Schinus molle*

تم الحصول على عزلتين فطريتين وتحديدتهما وفقا للمعايير الظاهرية و المجهرية (*pinicilium sp*, *Aspergillus niger*). يتم اختبار نشاط الزيوت الأساسية المستخلصة لفاكهة *Schinus molle* بواسطة التحلل المائي hydrodistillation على الفطريات بطريقة البقعة (Spot) وذلك لحساب نسبة التثبيط.

بالنسبة للزيوت الأساسية أظهرت النتائج التي تمت الحصول عليها أن هذا الزيت له نشاط فطري منخفض ضد *Aspergillus niger* و هو نوع يؤثر بشكل كبير على جودة القمح المخزن.

الكلمات المفتاحية: القمح الصلب المخزن, *Pinicilium sp*, *Aspergillus niger*, الزيوت الأساسية, *Schinus molle*.

Abstract

The present work has the following objectives: to identify molds of durum wheat (*Triticum durum*) stored for three years, provided by a farm in Ain Belomrane, wilaya de bordj bou arréridj, and to evaluate, in vitro, the activity of the essential oil of the fruit of the tree *Schinus molle*, aromatic plant used in traditional therapy, with the aim of using it as a food preservative.

Two fungal isolates were obtained and identified according to the macro and microscopic criteria, *Penicillium sp.* and *Aspergillus niger*,

The antifungal activity of the essential oil, the extract of *schinus molle* fruit was obtained by hydrodistillation, is tested by the spot seeding method (spot) in PDA medium to calculate the percentage inhibition.

As for the essential oil, the results obtained show that this oil has a low fungistatic activity against *Aspergillus niger*, a species that significantly affects the quality of stored wheat.

Key words: Stored hard wheat, *Penicillium sp*, *Aspergillus niger*, Hydrodistillation, Essential oil, *Schinus molle* .

Résumé

Le présent travail se propose comme objectifs : identifier des moisissures du blé dur (*Triticum durum*) stocké depuis trois ans , fourni par une ferme de Ain Belomrane, de la wilaya de bordj bou arréridj, et évaluer, in vitro, l'activité de l'huile essentielle des fruits de l'arbre *Schinus molle*, plante aromatique utilisée en thérapie traditionnelle, dans le but de l'utiliser comme un conservateur alimentaire.

Deux isolats fongiques ont été obtenus et identifiés selon les critères macro et microscopiques, ce sont *Penicillium sp.* et *Aspergillus niger*.

L'activité antifongique de l'huile essentielle, extrait des fruits de *schinus molle a* été obtenu par hydrodistillation, est testée par la méthode d'ensemencement en touche (en spot), en milieu PDA afin de calculer le pourcentage d'inhibition.

Quant à l'huile essentielle, les résultats obtenus montrent que cette huile a une faible activité fongistatique vis-à-vis d'*Aspergillus niger*, espèce qui altère d'une façon prononcée la qualité du blé stocké.

Mots clés: Blé dur stocké, *Penicillium sp.*, *Aspergillus niger*, huile essentielle, *Schinus molle*.