

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 الإخوة منتوري قسنطينة I
Frères Mentouri Constantine I University
Université Frères Mentouri Constantine I

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de biologie appliquée

كلية علوم الطبيعة والحياة
قسم البيولوجيا التطبيقية

Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de Master Professionnel

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie
Filière : Sciences Biologiques
Spécialité : Bio-industrie, Analyse et Contrôle (BAC)

N° d'ordre :
N° de série :

Intitulé :

***Bacillus une potentiel rhizobactérie favorisant la
croissance de plantes***

Présenté par : Bouzeraib Abdelatif

Le 22/06/2022

Mekiou Meriem

Jury d'évaluation :

Encadreur : Dr. MILET ASMA MCB - Université Frères Mentouri, Constantine 1.
Examineur 1 : Dr. HARZALLAH BESMA MCB- Université Frères Mentouri, Constantine 1.
Examineur 2 : Dr. BETAICHE INSAF MCB - Université Frères Mentouri, Constantine 1.

Année universitaire
2021 – 2022

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, nos remerciements les plus sincères s'adressent à ALLAH le miséricordieux,
qui m'a doté de volonté, du
courage, de force et de patience pour pouvoir continuer
dans les moments les plus difficiles ... de m'avoir aidé à
franchir tous les obstacles, me permettant de mener à
terme ce modeste travail.

A notre Encadreur **Mme Milet Asma**

Nous vous remercions pour la gentillesse et la spontanéité avec lesquelles vous aviez bien
voulu diriger ce travail.

Nous avons eu un grand plaisir de travailler sous votre direction. Nous vous exprimons nos
remerciements les plus sincères pour vos conseils précieux en toute circonstance avec
sympathie, sourire et bienveillance. Votre amabilité, votre compétence et vos qualités
humaines et professionnelles nous inspirent une admiration et un grand respect.
Nous voudrions être dignes de la confiance que vous nous aviez accordée et vous prions,
cher Maître, de trouver ici le témoignage de notre sincère et profonde gratitude.

Merci

Comme nous remercions également les membres du jury
d'avoir accepté d'évaluer notre travail,
présidente du jury **Mme Harzallah Besma** (M.C.B - UFM Constantine), et l'examinatrice
Betaiche Insaf (M .C.B - UFM Constantine).

Un grand merci à **Mme Leila** et **Mme Mounia** l'ingénieur de laboratoire de biologie
appliquée, pour son aide précieuse.

Je tiens à remercier aussi tous mes profs, pour leurs soutien et conseils tout le long de notre
étude universitaire.

Un grand merci à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin, d'une
façon ou d'une autre, à l'aboutissement de ce travail.

Dédicaces

Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, et le respect que j'ai toujours eu pour vous mes chers parents Rabah et Nora , vous m'avez donné la meilleure éducation, vous m'avez toujours encouragé et motivé dans mes études. Ce travail est le fruit de vos sacrifices.

A mes frère Haithem, et Youcef .

A mon binôme, Bouzeraib Abdelatif

A toutes mes amies.

A tous ce que j'aime et qui m'aiment.

A tous mes camarades d'études.

A toute personne qui m'a soutenu et entouré durant cette période de mes études.

Meriem

Dédicaces

Je dédie mon travail modeste :

A mes chers parents,

Tahar et Saida pour tout ce que vous m'avez inculqué et appris.

A mon père,

Pour sa présence et son exemple .pour ces conseils en or, aujourd'hui je suis la a cause de toi

A ma mère,

Pour la tendresse et l'amour que tu m'as apporté. Pour avoir toujours cru en moi
Ta présence et les encouragements sont pour moi les piliers fondateurs de ce que je suis et
de ce que je fais.

A mes deux frères,

Akram et Abderahim , vous êtes le bonheur de ma vie

Je vous aime

A mes amis,

Tous mes amis sans exceptions venus du ciel, j'aimerais que notre amitié dure toujours

Merci

**Un grand merci pour MERIEM, mon binôme qui m'a aidé pour tout le temps que nous
avons passé ensemble**

Abdelatif

Sommaire

Remerciement	
Sommaire	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Liste d'abréviations	
1- Introduction	01
2- Revue bibliographique.....	01
2.1- L'épinard	04
2.1.1- Historique	04
2.1.2- Classification scientifique	04
2.1.3- Description botanique	05
2.1.4- Production mondiale.....	06
2.1.5- Reproduction	06
2.1.6- Variétés	06
2.1.7- La valeur nutritionnelle	07
2.1.8- Activité pharmacologique	08
• Activité anticancéreuse	08
• Propriété antioxydant	08
• Effet anti-arthrose	08
2.1.9- Composition chimique	08
• antioxydant	08
• Chlorophylle	09
• Glycolipides	09
• Flavonoïdes	09
• Composés phénoliques	09
• Caroténoïdes	09
• Vitamines	09
• Minéraux	09
2.2- Les maladies de l'épinard.....	10
2.2.1- Les moisissures	10

➤ Le mildiou (<i>Peronospora spinaciae</i>)	10
➤ La Rouille blanche (Albugo blanche)	10
➤ L'Anthracnose (<i>Colletotrichum spinaciae</i>)	11
➤ La Fusariose (<i>Fusarium oxysporum</i> sp. <i>Spinaciae</i>)	12
➤ La Fonte des semis (<i>Pythium</i>)	13
➤ La Cladosporiose (<i>Cladosporium variabile</i>)	13
2.2.2- Les virus	14
➤ Virus de la mosaïque du concombre	14
2.3- Moyen de lutte contre les agents phytopathogènes	15
2.3.1- La lutte génétique	15
2.3.2- La lutte chimique	15
2.3.3- La lutte physique	15
2.3.4- La lutte intégrée	16
2.3.5- La lutte biologique	16
➤ <i>Bacillus</i>	16
➤ Génétique	17
➤ Genre <i>Bacillus</i>	17
➤ Intérêt biotechnologique des <i>Bacillus</i>	17
2.3.6- Mécanisme de lutte biologique	18
➤ Compétition	18
➤ L'antibiose	18
➤ Production des sidérophores	19
➤ Antagonisme	19
2.4- La rhizosphère	19
2.4.1- La rhizosphère	19
2.4.2- La rhizoplane	19
2.4.3- La racine elle-même (end rhizosphère)	19
2.5- La microflore rhizosphérique	20

2.5.1- Définition de Rhizobactérie	20
2.6- Les Rhizobactérie promotrices de la croissance des plantes	20
2.6.1- Mécanismes impliqués dans la stimulation de la croissance des plantes par les PGPR.....	21
- Mécanisme directe	21
- Mécanisme indirecte	21
2.7- Interactions des plantes-microorganismes	21
3- Matériel et méthodes	23
3.1-Isolement de l'agent phytopathogène	23
3.1.1-Isolement	23
3.1.2- Purification	24
3.1.3-Identification de l'agent phytopathogène	24
-Observation macroscopique	24
-Observation microscopique	25
3.1.4- Conservation	25
3.1.5- Teste de phytopathogénicité de l'isolat fongique	25
➤ Calcul de la sévérité de la maladie	25
➤ Ré-isolement de l'agent pathogène	25
3.2-Isolement de l'agent antagoniste	26
3.2.1-Echantillonnage	26
3.2.2-Isolement des bactéries du genre <i>Bacillus</i>	27
3.2.3-Purification	28
3. 3 -La sélection d'un agent antagoniste ayant une activité antifongique	28
3.3.1- Etude microscopique de l'interaction	29
3.3.2- Pourcentage d'inhibition	29
3.4-Identification des microorganismes sélectionnés	29
3.4.1- Aspect Macroscopique	29
3.4.2- Aspect Microscopique	29
➤ A l'état frais	29
➤ Observation par coloration	30
➤ Coloration simple	30

➤ Coloration de GRAM	30
3.4.3- Test biochimique	30
➤ Recherche de la catalase	30
➤ Test du mannitol mobilité	30
➤ La galerie API 20	31
3.5- Détection des enzymes de dégradation de la paroi fongique.....	31
3.5.1- Activité amylolytique	31
3.5.2- Activité lypolytique	31
3.5.3- Activité chitinolytique	32
3.5.3- Activité protéolytique	32
3.6- Etude <i>in vivo</i> de l'effet de la souche bactérienne sélectionnée sur la tomate.....	32
3.7- Fermentation en milieu alternatif à base d'Azzola	33
3.7.1- Ensemencement de Bacillus sur milieu solide à base d'Azolla.....	33
3.7.2- Production sur milieu liquide	33
➤ Préparation de la pré-culture	34
➤ Préparation de milieu alternatif	34
➤ Inoculation de milieu de fermentation	34
➤ Les méthodes analytiques	34
1- Mesure du nombre de cellules	34
2- Mesure de la densité optique	35
3- Détermination de la matière sèche cellulaire	35
4- Analyse des métabolites	35
3.8- Lyophilisation	35
4- Résultats.....	36
4.1- Isolement de l'agent phytopathogène	36
4.2- Identification de l'agent phytopathogène	36
4.2.1- Etude des caractères macroscopiques et microscopiques	36
4.3- Test de phytopathogénicité.....	40
4.3.1- Calcul de la sévérité de la maladie	40
4.3.2- Ré-isollement de l'agent pathogène	41

4.4- Isolement de l'agent antagoniste	42
4.5- Sélection d'isolats à effet antagonistes.....	42
4.5.1- Évaluation du taux d'inhibition	44
➤ Etude microscopique de l'interaction	44
4.6- Identification d'isolat bactérien antagoniste.....	45
4.6.1- Observation macroscopique et microscopique.....	45
4.6.2- Test biochimique.....	46
➤ Test de catalase	46
➤ Test mannitol mobilité	47
➤ La galerie API 20.....	47
4.7- Test enzymatique.....	49
4.7.1- Activité chitinase	49
4.7.2- Activité protéasique	50
4.7.3- Activité amylolytique	50
4.7.4- Activité lypolytique	50
4.8- Etude in vivo de l'effet de la souche sélectionnée sur la tomate	50
4.9- Fermentation en milieu alternatif à base d'Azzola	51
4.9.1- Ensemencement de Bacillus sp.sur milieu solide à base d'Azolla	51
4.9.2- Production sur milieu liquide.	51
4.6.1- Dénombrement de cellules	51
4.9.3- Mesure de la biomasse	52
4.9.4- Détermination de la matière sèche cellulaire	53
4.9.5-Analyse des métabolites	53
4.10- Lyophilisation	54
5- Discussion	55
6- Conclusion et Perspective.....	60
7- Abstract	62
8- ملخص.....	63
9- Références bibliographiques.....	64
10-Annexe	

Liste des figures

N°	Titre	page
Figure 01	Dessin schématique d'une plante d'épinard avec des fleurs mâles et femelles	5
Figure 02	La maladie mildiou	10
Figure 03	La rouille blanche	11
Figure 04	La maladie de l'anthracnose	12
Figure 05	La maladie de la fusariose	12
Figure 06	La fente des semis	13
Figure 07	La maladie cladosporiose	13
Figure 08	La maladie de l'Alternariose	14
Figure 09	La maladie de mosaïque de concombre	15
Figure 10	Représentation schématique des différentes zones de la rhizosphère	20
Figure 11	Schéma représente l'interaction entre les plantes et les microorganismes dans la rhizosphère	22
Figure 12	Localisation géographique de la région de Ain Ben Sbaa, Hamma Bouzian (Constantine)	23
Figure 13	Les feuilles d'épinard présentant des symptômes de maladies	24
Figure 14	Le champ de prélèvement des échantillons situé à Dababya de Hamma Bouziane (Constantine)	26
Figure 15	Localisation géographique de la région Dababya, Hamma Bouzian (Constantine)	26
Figure 16	Une série de dilution décimale	27
Figure 17	Confrontation entre l'agent phytopathogène et l'agent antagoniste par contact direct sur milieu PDA	28
Figure 18	Aspect macroscopique de la colonie <i>Cladosporium sp</i> « Alt1 », A: recto, B:verso	36
Figure 19	Aspect microscopique de la souche <i>Cladosporium sp.</i> « Alt1 », A : représente un mycélium septé, B : conidies, C :petite conidie. GX 40	37
Figure 20	Aspect macroscopique de la souche <i>Alternaria sp.</i> « Alt2 », A: recto, B: verso	38
Figure 21	Aspect microscopique d' <i>Alternaria sp.</i> « Alt2 », A:GX10, B:la forme de spore GX40, C: la forme du thalle GX40, D : conidies de grand taille GX40	38
Figure 22	L'aspect macroscopique de la souche <i>Pythium sp.</i> « F », A: recto, B: verso	39
Figure 23	Aspect microscopique de la souche <i>Pythium sp.</i> « F », A:GX40, B: la forme du spore GX40	39
Figure 24	Test de pathogénicité de souches <i>Cladosporium sp.</i> , <i>Alternaria sp.</i> , <i>Pythium sp.</i> sur des plantules de tomate	40
Figure 25	Aspect macroscopique des isolats fongiques <i>Alt1</i> , <i>Alt 2</i> , <i>F</i> après ré-isolement	41
Figure 26	L'isolats bactériens obtenus a partir du sol de la zone de la rhizosphère de l'épinard	45
Figure 27	L'isolat bactérien sélectionné « B1 »	45
Figure 28	Observation microscopique de l'isolat bactérien (B1), GX40	46

Figure 29	Test de catalase pour la bactérie B1	46
Figure 30	Test mannitol mobilité	47
Figure 31	Résultats d'api 20 E après 48 h d'incubation A: témoin, B: résultats	47
Figure 32	L'aspect macroscopique de la souche <i>Bacillus sp.</i> Sur milieu solide à base d'Azolla	51
Figure 33	Production de biomasse par <i>Bacillus sp.</i> Dans deux milieux : alternative et milieu landy	52
Figure 34	La production de metabolites par la souche bactérienne <i>Bacillus sp.</i> Dans deux milieu à savoir : milieu landy et milieu alternatif à base d'azolla	53

Liste des tableaux

N°	Titre	Page
Tableau 01	la production mondiale d'épinards	06
Tableau 02	Inhibition <i>in vitro</i> de la croissance de moisissures phytopathogènes par l'isolat antagoniste (B1) après 7 jours d'incubation	43
Tableau 03	Taux d'inhibition de la croissance fongique par confrontation direct	44
Tableau 04	Etude microscopique de l'interaction entre la bactérie et les isolats fongiques	45
Tableau 05	Test de la galerie API 20 E	48
Tableau 06	Détection de l'activité d'amylase, lipase, protéase, et de chitinase de la souche bactérienne B1	49
Tableau 07	Résultat du test <i>in vivo</i> après 1 mois de repiquage et traitement	50
Tableau 08	Effet du traitement sur des plantules de tomate par la souche de <i>Bacillus sp.</i> dans des conditions de pots après 1 mois de repiquage	50
Tableau 09	Evaluation du nombre de cellules contenant dans le milieu de fermentation	52
Tableau 10	la matière sèche cellulaire pour milieu alternatif et milieu landy pendant 72 h	53

Liste d'abréviations

API : Appareillage et Procédé d'Identification

°C : Degré Celsius

µl: Microlitre

µm : Micromètre

CA : Chitine Agar

Cm : Centimètre

Dn: Diamètre moyen du champ de moisissure pathogène

Do: Diamètre moyen du champ de moisissure pathogène témoin

FAO : Food and Agriculture Organization

g : Gramme

GN : Gélose Nutritive

h: Heurs

H₂O: Eau

H₂O₂: Peroxyde d'Hydrogène

HCL : Chlorhydrique

L: Litre

min : Minute

mL :Millilitre

mm :Millimetre

NaCl : Chlorure de sodium

nm: Nanomètre

O₂: Oxygène

P : Pourcentage

PDA : Potato Dextrose Agar

PGPB : Planth Growth Promoting Bacteria

PGPR: Planth Growth Promoting Rhizobacteria

pH: Potentiel d'Hydrogène

SM : Suspension mère

V : Volume

Introduction

1- Introduction

L'épinard est un légume originaire d'Iran a été introduit pour la première fois en Chine au milieu du VIIe siècle par 76 % de productivité, suivie par l'Indonésie, le Japon, la Turquie et les États-Unis (FAO, 2006). L'épinard a une valeur nutritionnelle, leur teneur élevée en fer, iode et vitamines A, B, C et D, ils sont recommandés en cas d'anémie et possèdent des propriétés activatrices de la sécrétion pancréatique, anti-Spina bifide, hyperglycémiantes et hypotensives (Boulard, 2001). Il a aussi une valeur pharmacologique très vaste bénéfique à la santé humaine, telles que l'activité antioxydant, anti arthrose, anticancéreuse. Malgré son importance nutritive et pharmacologique, il y'a un manque accru dans la production d'épinard. Ceci est dû, essentiellement, aux agents phytopathogènes qui provoquent des maladies plus au moins graves. Parmi ces maladies l'Alternariose causée par la moisissure *Alternaria alternata* (Anyszka et al., 2018), la fente de soumis causée par la souche fongique *Pythium ultimum* (Anyszka et al., 2018).

La lutte chimique c'est la seule moyenne utilisée on Algérie pour éliminer les agents phytopathogènes, ils comprennent les pesticides qui sont des substances utilisées pour prévenir, éliminer ou contrôler les ravageurs des cultures maraîchères. Bien qu'ils aient des effets inhibiteurs sur les ravageurs qui nuisent aux plantes et aux animaux, les pesticides peuvent également être toxiques pour les humains et polluer l'environnement (Vieira, 2018). Alors il est nécessaire de trouver d'autres stratégies contre les agents phytopathogènes. En faite, la lutte biologique est un moyen très efficace et plus sécurisé sur la santé humaine.

En effet, plusieurs microorganismes ont été étudiés ou utilisés dans des applications de lutte biologique. En plus de son rôle dans la restauration de la biodiversité des écosystèmes, la lutte biologique joue également un rôle important dans le contrôle des maladies des plantes (Elizabeth et al., 1998). De plus certaines bactéries ont été identifiées comme ayant un potentiel d'utilisation dans le domaine de bio-contrôle. Ces bactéries appartiennent surtout à trois grandes familles qui sont les *Bacillaceae*, *Enterobacteriaceae* et *Pseudomonaceae* (Greathead et al., 1994).

Le genre *Bacillus* appartient à la famille des *Bacillaceae*, ce sont des Eubactéries. Les *Bacillus* sont des bactéries gram positif, unicellulaires, non photosynthétiques mais chimiohétérotrophes. Il est généralement mésophile (20°- 45°C) mais on y rencontre des espèces pouvant se développer à 10°C et d'autres à 50°C (Dellarras, 2007 ; Youcef Ali, 2014).

Environ 170 antibiotiques, généralement de nature peptidique, sont produits par les *Bacillus*. Certains sont utilisés en thérapeutique comme les bacitracines, les gramicidines, les polymyxines et les tyrocidines; d'autres ne présentent pas les conditions indispensables à une exploitation industrielle (toxicité, coût de production élevé...). Une grande majorité des antibiotiques peptidiques produits par les *Bacillus* sont actifs sur les bactéries mais d'autres ont une activité essentiellement antifongique (la bacilysine, la rhizocticine, la chlorotétaïne, la mycobacilline, les lipopeptides...) (Akpa, 2001)

Le grand intérêt que le monde scientifique et industriel porte à ces molécules vient de leurs activités tant biologiques que physico-chimiques qui leur confèrent des potentialités d'utilisation en agriculture et dans les industries agro-alimentaires, pétrolières, cosmétiques et pharmaceutiques. En effet, selon leur structure, ces molécules présentent des activités antifongique, antibactérienne, antitumorale, antivirale, antimycoplasmique, anticoagulante, hémolytique *in vitro*; ainsi que des propriétés moussantes, émulsifiantes et détergentes (Bonmatin *et al.*, 2003 ; Ongena *et al.*, 2007 ; MILET, 2017).

Les *Bacillus* peuvent être trouvées dans la partie rhizosphérique. La colonisation des racines par ces bactéries implique la chimio-taxie des exsudats racinaires, l'adsorption des micro-organismes sur les racines et enfin la compétition pour les substrats nutritifs. Cette seule colonisation peut entraîner l'occupation de sites suffisants pour empêcher la croissance des autres micro-organismes, y compris les agents phytopathogènes (Jacques, 1993; Ait KAI, 2013). L'absence de l'utilisation de la lutte biologique est limitée par le coût élevé de leur fabrication, de ce fait, dans le présent travail un nouveau milieu de culture fabriqué à partir de matière première disponible et moins cher a été proposé et qui est un milieu alternatif à base d'Azzola. Le choix de ce dernier a été effectué grâce à sa richesse en protéines et en éléments micro-minéraux, Fe, Mn, Zn et Co (Buckingham *et al.*, 1978), En plus d'être une source potentielle de protéines et d'énergie (Castillo *et al.*, 1982; Alcantara & Querubin, 1985).

L'objectif du présent travail est de déterminer l'influence de *Bacillus* sur la croissance des isolats fongiques qui causent des maladies de l'épinard dans l'optique d'une évaluation *in vitro et in situ* vis-à-vis des agents phytopathogènes. Dans le cadre de la promotion de croissance des plantes par *Bacillus sp.* isolé à partir du sol de la zone de la rhizosphère d'épinard. Cette étude sera poursuivie selon des stratégies, en l'occurrence:

- Isolement et identification morphologique des agents phytopathogènes à partir des échantillons de l'épinard présentant des symptômes de maladies;
- Isolement, identification et sélection des agents antagonistes du genre de *Bacillus* à partir du sol de la zone de la rhizosphère des plantes de l'épinard saines vis-à-vis des agents phytopathogènes;
- Etude microscopique de l'interaction entre l'agent antagoniste sélectionné et les agents phytopathogènes étudiés;
- Caractérisation de la souche performante et évaluation de sa capacité à produire des enzymes hydrolytiques (amylase, lipase, chitinase et protéase);
- L'influence de la souche performante « *in situ* » sur la croissance des plantules de tomate et voir l'effet promoteur et de bio-contrôle de cette dernière;
- L'influence de milieu à base d'*Azolla* sur la production de la biomasse bactérienne et des métabolites.
- La conservation de bactérie intéressante par lyophilisation.

Revue bibliographique

2- Revue bibliographique

2.1- L'épinard

2.1.1- Historique

L'épinard est un légume à feuilles vert foncé originaire d'Iran. Il a été introduit pour la première fois en Chine au milieu du VIIe siècle. Puis dans l'Europe du XIIe siècle. L'épinard est une culture légumière courante depuis le 14ème siècle, et il permet à toutes les zones de culture de s'intégrer désormais dans toute la flore actuelle en tant qu'espèce auto-adaptée (Diogon, 2002). Scientifiquement, il est appelé *Spinacia oleracea* et appartient à la famille des Chénopodiacées, connue localement sous le nom d'Isapanakh ; anglais : Spinach ; latin : *Spinaciaoleracea*; allemand : Spinat ; italien : Spinacio ; espagnol : Espinaca ; portugais : Espinafre ; catalan : Espinac et néerlandais : Spinazie . L'épinard est établi comme une plante et possède un appareil végétatif en forme de rosette (Seigneurin, 2000). À la floraison, cette plante a une tige florale feuillue avec des fleurs mâles ou femelles et est une plante dioïque (Diogon, 2002). Ses feuilles sont frisées ou plates selon les variétés, la première est souvent vendue fraîche, la seconde en conserve ou surgelée (Subhashet *al.*, 2010). Les parties les plus utiles sont les feuilles et les graines, suivies des tiges et des racines (Boullard, 2001). Il a été prouvé que les épinards contiennent du carotène, de l'acide ascorbique et divers minéraux et vitamines à forte activité antioxydant (Gil *et al.*, 1999 ; Lomnitski *et al.*, 2000). Parmi ses composants antioxydants : les polyphénols, les flavonoïdes et les caroténoïdes ont des activités anti-inflammatoires, antimutagènes, anti-tumorales et chimio préventives. Les épinards sont considérés comme un carminatif, un laxatif et un stimulant des sécrétions du tube digestif (Perry, 1986), et le jus de ses feuilles fraîches augmente le lait maternel et est utilisé dans le traitement de l'anémie, de la jaunisse, de la cirrhose et de la débilité générale (Yusuf *et al.*, 1994). Il est également utilisé comme diurétique et comme bain de bouche pour les maux de gorge.

2.1.2-Classification scientifique

La classification scientifique de l'épinard proposée en 2018 par VERNA est mentionnée comme suit :

- Règne : *Plantae*
- Sous-règne : *Tracheobionta*
- Super division : *Spermatophyta*
- Division : *Magnoliophyta*
- Classe : *Magnoliopsidé*
- Sous-classe : *Caryophyllidae*
- Ordre : *Caryophyllales*

- Famille : *Chenopodiaceae*.
- Genre : *Spinacia L*
- Espèce : *Spinacia oleracea* (verna,2018).

2.1.3-Description botanique

L'épinard est une plante herbacée annuelle ou bisannuelle, est caractérisée par:

- Type : potager.
- Tige : dressée de 30 à 60 cm de hauteur, ronde, lisse, sifflée, charnue, parfois rougeâtre.
- Feuilles : alternes, à longs pétioles dans la partie inférieure, différents lobes à lobes triangulaires à angle aigu, lisses des deux côtés (Fujita *et al.*, 2017).
- Fleurs :
 - Fleurs mâles: très nombreuses sur de longues épines apicales et des tiges rachidiennes courtes en agrégats, sessiles, calice à 4 parties, 4 étamines, anthères jumelles, grandes.
 - Fleurs femelles: axillaires, sessiles, denses, calice à 2 pointes, avec une corne saillante de chaque côté, les graines deviennent des épines à maturité et blanchissent progressivement. Capsule 1-loculeuse, 1-mère, armée, à 2 paires de cornes courtes opposées, couronnées du reste du calice, contenant un ovaire sur un périanthe sphérique, 2-4 dents au sommet.
- Fruits : Ils sont constitués de 2 pointes lisses divergentes.
- Graines: verticales (Verma, 2018).



Figure 1 Dessin schématique d'une plante d'épinard avec des fleurs mâles et femelles (Arnau *et al.*, 2019)

2.1.4- Production mondiale

La production mondiale d'épinards est dominée par la Chine (76 % de la production), suivie par l'Indonésie, le Japon, la Turquie et les États-Unis (FAO, 2006). Au niveau de la Communauté européenne, la production totale d'épinards cultivés est d'environ 400 000 tonnes. L'Italie arrive en tête avec 94 000 tonnes (environ 24 %) suivie de la France avec 94 000 tonnes (environ 21 %). Les autres grands producteurs sont l'Espagne (54 000 tonnes, soit 14 %), les Pays-Bas (51 000 tonnes, soit 13 %), la Grèce (42 000 tonnes, soit 10 %), la RFA (38 000 tonnes, soit 9 %) et la Belgique (31 000 tonnes, ou 10% soit 8%)(tableau1). Selon Munro et Small (1998), il existe deux types de production : les épinards de printemps et les épinards d'automne, auxquels s'ajoute une production estivale minime. Dans la production commerciale, les épinards sont cultivés pour répondre aux demandes du marché local en matière de mise en conserve et de congélation (Munro et Small, 1998).

Tableau 1 la production mondiale d'épinard (Atlasbig.com)

Pays	Production (tonnes)	Production par personne (Kg)	Superficie (en hectares)	Rendement (Kg / Hectare)
 République populaire de Chine	23 805 539	17,079	739 715	32 182
 États-Unis d'Amérique	384 669	1,174	24 868	15 468,4
 Japon	226 382	1,79	20 250	11 179,4
 Turquie	225 174	2,786	17 713	12 712,1
 Kenya	169 356	3,324	9 163	18 483
 Indonésie	162 277	0,612	39 619	4 095,9
 France	127 785	1,899	6 151	20 774,7
 Iran	116 954	1,431	6 269	18 655,3
 Pakistan	108 725	0,539	8 820	12 327,1
 Italie	102 532	1,697	6 593	15 552

2.1.5- Reproduction

L'objectif principal des programmes de sélection d'épinards est de développer des variétés présentant des caractéristiques de résistance aux maladies et de tolérance aux stress abiotiques, tels que le stress thermique, le stress hydrique, le stress salin et hydrique (Ors et Suarez, 2017), et également d'augmenter le rendement et la qualité, tels que comme une diminution des niveaux de nitrate et une augmentation du pourcentage de folate dans les épinards grâce à différentes techniques physiologiques et génétiques (Roughaniet *al.*, 2017).

2.1.6-Variétés

Il existe plusieurs classifications de cultivars basées sur les caractéristiques des fruits et des feuilles. Une distinction majeure se fait entre les variétés de fruits épineux, classées comme var. *oleracea* et les variétés à fruits ronds et sans épines sont classés dans la var. *inermis* (Moench).

- Variables : *Inermis* (moench), aux fruits ronds et lisses, appelés épinards à graines rondes, épinards ronds ou épinards d'été.
- Variables : *oleracea* également connu sous le nom d'épinards épicés ou d'épinards d'hiver, avec des fruits.

Ses plantes sont plus larges et plus ramifiées que var. *inermis*, plante au printemps ou au début de l'été pour une récolte rapide. Il est également planté à la fin de l'été en préparation de la récolte d'automne. La variété de chou semble être la forme la plus primitive (Munro et Small, 1998).

Les variétés sont également regroupées selon la couleur des feuilles (vert clair ou vert foncé) et la texture des feuilles (lisse, semi-lisse et pétillante).

Exemples de cultivars selon Munro et Small (1998) :

- Epinard à feuilles froissées : *America*, *long standing*, *blooms*, *le dark green*, *vienna*.
- Epinard à feuilles semi-froissées : *Melody*, *tyee*.
- Epinard à feuilles lisses : *Olympia*, *symphony*.

2.1.7- La valeur nutritionnelle

Les épinards sont une plante polyvalente qui peut être consommée crue ou cuite. Ses feuilles sont majoritairement composées à 69% d'eau et sont très riches en cellulose, ce qui en fait un aliment efficace contre la constipation. De plus, compte tenu de leur teneur élevée en fer, iode et vitamines A, B, C et D, ils sont recommandés en cas d'anémie et possèdent des propriétés activatrices de la sécrétion pancréatique, anti-spina bifida, hyper glycémiantes et hypotensives (Boulard, 2001) . Selon Boullard (2001), Couplan (2009) et Lacoste (2014), les feuilles d'épinard sont riches en minéraux et oligo-éléments : teneur en potassium (529 mg/100 g) ; calcium (104 mg/100 g) et magnésium (58 mg /100 g) est impressionnant, tandis que le fer est loin d'être négligeable, plus : P, K, Na, Cl, S, Mn, Zn, Cu, I. Les épinards contiennent également beaucoup de vitamines : A, B1, B2, B9, B12, C, E, K et PP, de la chlorophylle, du carotène, des flavonoïdes et de nombreux autres antioxydants comme la lutéine et la zéaxanthine. Les épinards agissent comme un véritable médicament naturel (Lacoste, 2014). Les épinards sont faibles en matières grasses, un aliment adapté aux personnes obèses et diabétiques, et une bonne source de chlorophylle, essentielle pour faciliter la digestion (Roughani *et al.*, 2017).

2.1.8- Activité pharmacologique

➤ **Activité anticancéreuse**

L'administration orale d'épinards inhibe l'activité polaire chez les mammifères, la croissance des cellules cancéreuses humaines en culture et la prolifération des tumeurs solides *in vivo*. Cette partie peut aider à prévenir le cancer et constituer un aliment fonctionnel à activité anticancéreuse (Verna, 2018).

➤ **Propriété antioxydant**

Grossman a rendu compte de la composition chimique des constituants antioxydants naturels (NAO) des épinards. Cette étude a démontré la présence de flavonoïdes et de dérivés de l'acide coumarique en tant que composants antioxydants de l'extrait aqueux de feuilles d'épinard (Verna, 2018).

➤ **Effet anti-arthrose**

Les feuilles d'épinards sont utilisées comme remède traditionnel persan contre les douleurs articulaires, en particulier l'arthrose et la polyarthrite rhumatoïde. Les effets anti-arthrose et chondroprotecteurs de l'extrait d'épinard ont été évalués chimiquement pour l'arthrose. Les résultats ont montré que l'extrait d'épinard est un puissant agent antioxydant et anti-inflammatoire (Rao *et al.*, 2015).

L'effet anti-arthrosique de l'extrait éthanolique de chou (SOE) a été évalué *in vivo* par injection intra patellaire d'iodoacétatemonosodique (MIA) au niveau du genou du rat similaire à l'arthrose. Trouvé dans la région du genou humain, où l'inflammation et la production de radicaux libres sont augmentées. Les résultats montrent que le traitement SOE fournit une résistance fonctionnelle et structurelle au cartilage en augmentant le nombre de traboulés dans le volume tissulaire et le volume osseux, en évitant la dégradation de la matrice extracellulaire et des composants chondrocytaires dans des zones spécifiques, et en outre, le traitement SOE augmente l'amplitude de mouvement des articulations. Et réduire la douleur associée aux mouvements articulaires (Rosa, 2019).

2.1.9- Composition chimique

➤ **Antioxydant**

Les épinards contiennent une variété d'antioxydants, y compris de grandes quantités de lutéine et de zéaxanthine ainsi que des composés de la famille des caroténoïdes. De manière générale, les antioxydants aident à neutraliser les radicaux libres dans l'organisme et préviennent également l'apparition de maladies cardiovasculaires, de certains cancers et de diverses maladies chroniques. Lutéine et zéaxanthine bénéfiques pour la santé oculaire (Ma et Lin, 2010).

➤ **Chlorophylle**

Environ 1 % des épinards secs sont de la chlorophylle, un pigment vert présent dans de nombreux légumes à feuilles. Selon (Reddy *et al.*, 2005), la chlorophylle a la capacité d'inhiber la croissance des cellules cancéreuses humaines. La quantité de chlorophylle contenue dans les épinards est d'environ 130 mg pour 100 g d'épinards (Reddy *et al.*, 2005).

➤ **Glycolipides**

L'épinard serait l'une des plantes avec le plus de glycolipides (après le thé vert et persil) (Larsen et Christensen, 2007), ces composés ont des effets anticancéreux (Maeda et Hada, 2005), et possède également des propriétés anti-inflammatoires (Shiota, 2010). La plupart des recherches effectuées à ce jour ont été menées sur des animaux, non études cliniques, il est difficile de dire si ces propriétés peuvent être appliquées à l'homme en mangeant des épinards.

➤ **Flavonoïdes**

Les épinards sont riches en flavonoïdes. Divers flavonoïdes ont été signalés comme Quercétine ; Myricétine ; Campaverol ; Apigénine ; Lutéoline ; Patuline ; Extrait d'épinard ; Jexinidine ; 4-glucuronide ; 5,3,4-trihydroxy-3-méthoxy-6:7-méthylènedioxyflavone-4-glucuronide ; 5,4-dihydroxy-3,3-diméthoxy-6:7-méthylènedioxyflavone-4-glu-curonide ; 5,4-dihydroxy-3,3-diméthoxy-6,7-méthylène-dioxyflavone (C₁₈H₁₄O₈.); 3,5,7,3, 4-pentahydroxy-6-Méthylflavones (Deven et Sateesh, 2014).

➤ **Composés phénoliques**

Les polyphénols isolés de la plante sont l'acide para-coumarique, l'acide férulique, l'acide ortho-coumarique (Deven et Sateesh, 2014).

➤ **Caroténoïdes**

Les épinards montrent la présence de différents caroténoïdes comme la lutéine, le β-carotène, la violaxanthine et la 9-Z-neoxanthine (Deven et Sateesh, 2014).

➤ **Vitamines**

Spinacia oleracea contient des concentrations élevées de vitamines A, E, C et K, et Acide folique et acide oxalique (Deven et Sateesh, 2014).

➤ **Minéraux**

En plus de ces produits chimiques, les épinards contiennent également plusieurs minéraux tels que le magnésium, Sels de manganèse, de calcium, de phosphore, de fer, de zinc, de cuivre et de potassium (Deven et Sateesh, 2014).

2.2-Les maladies de l'épinard

2.2.1- Les moisissures

- Milidou (*Peronospora spinaciae*)

Des taches jaunes apparaissent sur le dessus des feuilles. Sur la partie inférieure des feuilles, sous les taches, des poils gris-violet se forment. Par temps humide et frais, ces taches peuvent s'étendre et recouvrir toute la feuille. Les tissus attaqués deviennent cassants et tombent de la plante (figure 2). Des températures inférieures à 24 degrés Celsius et une humidité élevée favorisent l'apparition de maladies (Anyszka *et al.*, 2018).

-Taxonomie

La classification scientifique de *Peronospora spinaciae* proposée en 2018 par Anyszka est mentionnée comme suit :

- Rang: *Peronosporales*
- Famille: *Peronosporaceae*
- Espèce *Peronospora effusa* (syn. *Peronospora spinaciae*) (Anyszka *et al.*, 2018)



Figure 2 La maladie de milidou (nexles.com)

- La rouille blanche (*Albugo blanche*)

Des taches jaunes décolorées apparaissent sur le dessus des feuilles (figure 3). La maladie développe des fructifications du champignon sur la face inférieure des feuilles, ainsi que des structures rondes blanches. En cas d'attaque sévère, les feuilles se flétrissent et tombent.

-Taxonomie

La classification scientifique d'*Albugo occidentalis* proposée en 2018 par Anyszka est mentionnée comme suit :

- **Rang :** *Peronosporales*
- **Famille:** *Peronosporaceae*
- **Espèce :** *A. occidentalis* (Anyszka *et al.*, 2018)



Figure 3 La rouille blanche (nexles.com)

-L'anthracnose (*Colletotrichum spinaciae*)

Plusieurs feuilles jaunes ou blanches apparaissent sur les feuilles atteintes. Si les conditions environnementales sont favorables, ces taches se combinent et recouvrent la surface des feuilles. Les feuilles brunissent et tombent progressivement (figure 4). Si la température et l'humidité sont élevées, la maladie peut détruire toute la culture. Pendant l'hiver, le champignon vit sur les débris végétaux à la surface du sol (Anyszka *et al.*, 2018).

-Taxonomie

La classification scientifique de *Colletotrichum spinaciae* proposée en 2018 par Anyszka est mentionnée comme suit :

- **Rang :** *Phyllachorales*
- **Famille:** *Phyllachoraceae*
- **Espèce :** *Colletotrichum spinaciae* (Anyszka *et al.*, 2018).



Figure 4 La maladie de l'antracnose

-La Fusariose (*Fusarium oxysporum*)

Le premier symptôme est le jaunissement des feuilles matures (figure 5). La maladie se développe et, en peu de temps, la plante entière se dessèche et meurt. Si vous coupez à partir de la racine, vous verrez le tissu conducteur bruni et bloqué par le mycélium fongique. Des températures supérieures à 27°C et une sécheresse prolongée favorisent les maladies (Anyszka *et al.*, 2018).

-Taxonomie

La classification scientifique de *Fusarium oxysporum* proposée en 2018 par Anyszka est mentionnée comme suit :

- **Rang :** *Fungi*
- **Famille:** *Nectriaceae*
- **Espèce :** *Fusarium oxysporum*



Figure 5 La maladie de la fusariose

-La fonte des semis (*Pythium*)

C'est l'une des maladies les plus importantes des semis, se manifestant du stade de la germination et de l'émergence au stade 2-3 vraies feuilles (figure 6). En cas d'attaque, les tissus du sol s'assombrissent, deviennent aqueux et pourrissent. Le développement de la maladie est affecté par des températures comprises entre 18 et 30 degrés et une humidité supérieure à 90% (Anyszka *et al.*, 2018).



Figure 6 la maladie de fente des semis

- La Cladosporiose (*Cladosporium variable*)

Le champignon attaque les feuilles et peut provoquer des dégâts importants (75% à 100%). Des taches irrégulières apparaissent sur le dessus des feuilles (figure 7). Peu à peu, la maladie progresse et sur la face inférieure des feuilles, sous les taches, des poils gris-violet apparaissent. Le tissu affecté se dessèche et se détache (Anyszka *et al.*, 2018).



Figure 7 La maladie de Cladosporiose

- Alternariose (*Alternaria alternata*)

L'agent pathogène a formé de petites taches circulaires avec des cloisons concentriques sur les feuilles d'épinard, qui se sont ensuite transformées en une surface noire irrégulière clairement

séparée du tissu foliaire sain. Au fil du temps, ces taches recouvrent de plus en plus la surface des feuilles (figure 8). La maladie se développe mieux à l'automne (Achetbi, 2021).



Figure 8 La maladie de l'Alternariose (Jones *et al.*, 2014)

-Taxonomie

La classification scientifique de *Alternaria alternata* proposée en 2018 par Anyszka est mentionnée comme suit :

- **Rang :** *Pleosporales*
- **Famille:** *Pleosporaceae*
- **Espèce :** *Alternaria alternata* (Anyszka *et al.*, 2018)

2.2.2- Les virus

- Virus de la mosaïque du concombre

Le virus attaque la plupart des légumes, y compris les épinards. Des taches jaunes de forme irrégulière apparaissent sur les feuilles des plantes atteintes (figure 9). Le tissu se développe de manière inégale. Cela peut entraîner la déformation des feuilles. Aux stades avancés de la maladie, les bords des feuilles jaunissent puis brunissent. Les plantes se dessèchent progressivement et meurent (Anyszka *et al.*, 2018).



Figure 9 La maladie de la mosaïque de concombre

2. 3-Moyen de lutte contre les agents phytopathogènes

Pour aboutir à des cultures et des récoltes saines, quelle que soit la région, on doit faire appel à des méthodes de lutttes efficaces (Champion *et al.*, 2009).

2.3.1- La lutte génétique

La lutte génétique, très utilisée ces dernières décennies, permet de créer des cultivars résistants en utilisant les ressources génétiques intra- et inter-espèces. Une résistance spécifique, très efficace contre un agent pathogène donné peut toutefois être rapidement contournée par mutation, particulièrement lors des cultures successives et prolongées. Une résistance plus générale quant à elle, n'est pas totale mais ralentit la progression de la maladie causées par un grand nombre d'agents pathogènes (Hanemian, 2012).

2.3.2- La lutte chimique

Les traitements chimiques sont largement utilisés pour combattre les maladies bactériennes. Les quelque 120 matières actives antiparasitaires disponibles sont dans leur grande majorité des molécules organiques de synthèse, avec toutefois quelques substances minérales dont le soufre élémentaire et des produits cupriques, ainsi que des antibiotiques autorisés dans certains pays (mais interdits dans d'autres) contre des bactéries phytopathogènes (Lepoiver, 2003).

2.3.3- La lutte physique

Il faut empêcher la conservation des agents phytopathogènes dans l'environnement, les débris de plantes malades, sont susceptible de produire un inoculum capable d'attaquer les plantes cultivées saines placées dans un substrat sain. En vue de limiter ces sources, potentielles de contamination plusieurs méthodes préventives peuvent être utilisées

notamment la destruction par le feu des débris végétaux infectés ou leur enfouissement dans le sol (Vanderbergh, 2015).

2.3.4- La lutte intégrée

Dans la protection intégrée, il est important d'éviter de détruire les organismes bénéfiques dans l'aire de répartition de notre champ. Ceci peut être réalisé en protégeant de nombreuses espèces végétales. Ils comprennent les organismes: *Pythium oligandrum*, *Trichoderma spp*, *Coniothyrium minitans* et *Bacillus subtilis*. La méthode intégrée de protection contre les maladies n'exclut pas l'utilisation de fongicides pour combattre les maladies infectieuses. Les mesures recommandées dans le système de protection intégré devraient répondre aux conditions suivantes: faible toxicité pour l'homme et les animaux, dynamique de décomposition rapide et non-accumulation dans l'environnement, sélectivité pour les insectes utiles, exploitation sûre et lutte simultanée contre un large éventail de maladies (Anyszka *et al.*, 2018).

2.3.5- La lutte biologique

La lutte biologique est une méthode de lutte contre les parasites, les maladies et autres ravageurs de cultures. Son but est de réduire, voire d'annuler leur impact négatif sur les cultures sans répandre de pesticides mais en utilisant des organismes auxiliaires (Suty, 2010). Un auxiliaire est un organisme vivant qui va avoir une action régulatrice sur des ravageurs de cultures (Jourdeuil *et al.*, 1991).

La lutte biologique a une efficacité relative et demande plus de connaissances et d'observations, mais à long terme, elle est beaucoup plus intéressante sur le plan environnemental et économique (Toussaint, 2007).

- *Bacillus*

Les *Bacillus* sont des bactéries ubiquitaires. Ils sont retrouvés dans divers environnements tels que les plantes et sols, les événements hydrothermaux, des environnements extrêmes, l'eau de mer, etc (Hamdache *et al.*, 2013).

Les *Bacillus spp*, étant directement associées aux plantes et à l'environnement du sol, elles sont utilisées dans la lutte biologique par la production des molécules bioactives qui ont une capacité d'inhibition des agents phytopathogènes (Horak *et al.*, 2019). *Bacillus* est un genre de bactéries à Gram positif qui appartient à la famille des *Bacillaceae*. Il compte environ 140 espèces. (Kunstetal., 1997). Les espèces de *Bacillus* sont en forme de bâtonnets, endosporeuses, aérobies ou anaérobies facultatives (Peter *et al.*, 2015).

➤ Génétique

L'hétérogénéité des *Bacillus* est aussi retrouvée au niveau de leur ADN ainsi leur contenu en G+C varie entre 32-66 (Schleifer, 2009). Le genre *Bacillus* contient en moyenne 4973 ± 923 gènes. Les espèces du groupe *cereus* ($5\,716 \pm 354$ gènes) ont les plus grands génomes et les plus petites génomes sont les espèces du groupe *B. Eoahuilensi* (Alcaraz *et al.*, 2010). Le génome de *B. subtilis* comporte en moyenne 4-5% de gènes codant pour la synthèse d'antibiotiques (Ongena et Jacques, 2008).

➤ Genre de *Bacillus*

Il existe un grand nombre d'espèces avec des propriétés physiologiques différentes et des habitats très différents (terre, poussière, etc.). Certaines espèces se trouvent en eau douce, d'autres en eau de mer. Il existe des espèces thermophiles, acidophiles, psychrophiles et alcalophiles. Les espèces saprophytes sont responsables de multiples dégradations des aliments (acides lactiques, caillé, etc.). Certains d'entre eux ont des rôles utiles en tant que producteurs d'antibiotiques (caséothricine, polymyxine, bacitracine...).

Le genre regroupe des bactéries GRAM positive caractérisées par leur forme bâtonnet, ont la capacité de former des endospores qui sont hautement résistantes à la chaleur, à la sécheresse et la dégradation chimique (Gordon *et al.*, 1973).

➤ Intérêt biotechnologique des *Bacillus*

Le genre *Bacillus* est un genre bactérien présentant un intérêt très important en biotechnologie. Les bactéries du genre *Bacillus* sont connues pour produire des molécules qui ont diverses applications industrielles telles que la production des enzymes (Devine, 1995). Les bactéries de ce genre produisent des enzymes appelées protéases intra et extracellulaires, qui constituent l'une des familles d'enzymes les plus étudiées et les plus utilisées dans les processus industriels (Gupta *et al.*, 2002). Elles ont de nombreuses applications dans la production industrielle de différents produits, notamment les détergents, les aliments, les produits pharmaceutiques, le cuir, les diagnostics, la gestion des déchets et la récupération de l'argent (Karbalaei-Heidari *et al.*, 2009). La bactérie *Bacillus safensis* par exemple a la capacité pour produire quelque enzyme comme amylase, cellulase, protéase, lipase, xylanase, chitinase (Agbaje *et al.*, 2015). *Bacillus* est également impliqué dans la formation de métabolites primaires tels que les vitamines et les ribonucléosides, ainsi que de métabolites secondaires tels que les bactériocines et les biosurfactants. Les biosurfactants produits par *Bacillus spp.* sont utilisés dans les industries pétrolière, pharmaceutique et alimentaire, par exemple. Les glycolipides, les lipopeptides, les

lipopolysaccharides et les glycoprotéines sont des exemples de biosurfactants (Makkar RS *et al.*, 2011). Les lipopeptides sont connus pour avoir des activités antibactériennes, antivirales, et permettent également de lutter contre les tumeurs (Cameotra *et al.*, 2004). Il a été rapporté que *B. pumilus* produit aussi la surfactine (Slivinski *et al.*, 2012), ce qui supposerait que cette bactérie ait aussi des propriétés dans les applications thérapeutiques. Ainsi, elle est applicable en tant que bactérie favorisant la croissance des plantes (Kothari *et al.*, 2013). *Bacillus* ont également présenté des bons profils fermentaires et probiotiques, elles peuvent ainsi être utiles pour constituer un ferment destiné à la bioconversion des feuilles de manioc (Voudibio, 2016).

2.3.6- Mécanisme de lutte biologique

La protection conférée par un microorganisme de lutte biologique s'appuie sur un ou plusieurs mécanismes d'antagonisme, est une interaction directe entre deux microorganismes partageant la même niche écologique (Alabouvette *et al.*, 2006), tels que la compétition (pour éléments nutritifs, l'oxygène, l'espace), l'antibiose, le parasitisme et la production des sidérophores. L'étude de ces mécanismes d'action est une étape importante dans le développement de la lutte biologique (Jijakli, 2003).

➤ Compétition

La compétition entre deux ou plusieurs microorganismes concerne soit l'élément nutritif, l'espace ou les autres facteurs environnementaux qui deviennent limitatifs pour la croissance. L'effet sélectif des exsudats racinaires sur la microflore serait le résultat de la compétition qui oppose des souches à croissance lente et des souches à croissance rapide, ces dernières sont particulièrement favorisées dans la rhizosphère (Alabouvette *et al.*, 2006). La compétition spatiale contribue aussi à la réduction des infections racinaires par les agents phytopathogènes. En effet, les microorganismes ayant la capacité de coloniser les racines comme les bactéries promotrices de la croissance des plantes (Plant Growth Promoting Bacteria, PGPB) protègent les racines et occupent les sites d'infection aux agents phytopathogènes (Benítez *et al.*, 2004).

➤ L'antibiose

La sécrétion de substances antibiotiques par les microorganismes est un phénomène fréquent. Certains métabolites sont capables d'interférer avec la germination, la croissance mycélienne et/ou la sporulation des agents phytopathogènes, D'autres entraînent l'ère largage de composés cellulaires suite à la perturbation de la perméabilité cellulaire, L'antibiose est le mode d'action le plus étudié chez les agents de lutte biologique (Jijakly, 2003).

➤ Production des sidérophores

Les sidérophores sont des molécules extracellulaires qui possèdent une grande affinité pour le fer ferrique (Fe^{3+}). Ce dernier est présent dans le sol à faible concentration sous forme de $\text{Fe}(\text{OH})$. Les champignons et toutes les bactéries aérobies et anaérobies facultatives produisent une grande variété de sidérophores. Les sidérophores produits par *Bacillus subtilis* en séquestrant le fer ferrique au niveau de la rhizosphère peuvent causer l'inhibition des autres micro-organismes y compris les phytopathogènes dont l'affinité pour le fer est faible (Jijakly, 2003).

➤ Antagonisme

En écologie, le terme d'antagonisme désigne une inhibition ou une action défavorable d'un organisme sur la virulence d'agents phytopathogènes se conservant dans le sol ou bien vis-à-vis d'un autre à l'intérieur d'une population microbienne mixte. L'antagonisme se manifeste généralement soit par une compétition, un hyper parasitisme, une production de sidérophores ou par une antibiose (Djellout *et al.*, 2019).

2.4- La rhizosphère

Le terme rhizosphère a été introduit en 1904 par Lorenz Hiltner (Anton *et al.*, 2008), bactériologiste et professeur d'agronomie en microbiologie des sols à l'Institut technique de Munich (LOMBI *et al.*, 2001). Aujourd'hui, la rhizosphère est définie comme le lieu où le sol, les plantes et les micro-organismes interagissent. Ces interactions dépendent des conditions physiques du milieu et des organismes impliqués (Norini, 2007). Les composants physicochimiques et biologiques de la rhizosphère sont significativement différents des sols cultivés et non cultivés (Morgan *et al.*, 2005). La rhizosphère est en fait un habitat mal défini, car elle représente un gradient microbien et physico-chimique depuis la racine elle-même jusqu'à une distance de plus ou moins 1 à 5 mm, au-delà de laquelle l'effet rhizosphère disparaît (Nihorimbere *et al.*, 2010 ; Qureshi., 2012).

IL existe trois composantes distinctes reconnues dans la rhizosphère (figure10) :

2.4.1- La rhizosphère : qui est la zone du sol influencée par les racines grâce à la libération de substrats qui affectent l'activité microbienne.

2.4.2- La rhizoplane : qui est la surface de la racine, y compris les particules du sol adhérant fortement.

2.4.3- La racine elle-même (endorhizosphère) : est une partie du système racinaire, parce que certains micro-organismes endophytes sont capables de coloniser les tissus racinaires internes (Bowen et Rovira, 1991).

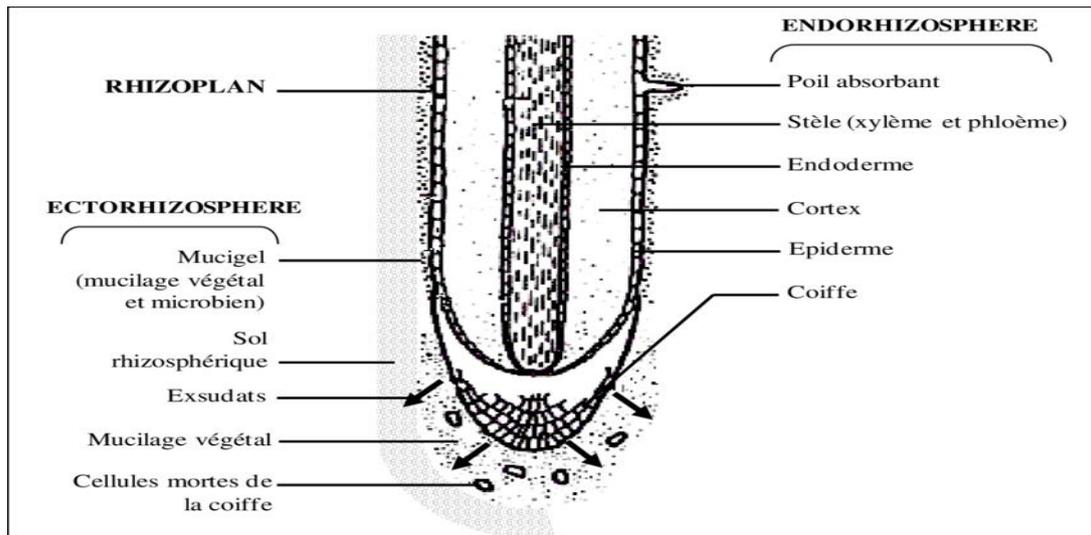


Figure 10 Représentation schématique des différents zones de la rhizosphère (Lzpinay, 2013)

2.5- La microflore rhizosphérique

La microflore du sol est complexe et diversifiée. Il comprend des bactéries, Champignons, protozoaires, etc. Cependant, les bactéries et les champignons sont les organismes les plus importants (Hoorman et Islam, 2010). La distribution de ces micro-organismes du sol sont hétérogènes, en fonction des facteurs nutritifs et facteurs physicochimiques (Prescott *et al.*, 2003).

2.5.1- Définition de Rhizobactérie

Les bactéries de la rhizosphère, dites rhizobactéries, sont capables de coloniser l'intérieur ou l'extérieur de la racine de nombreuses espèces de plantes et peuvent être divisé entre celles qui forment une relation symbiotique avec la plante et celles qui ne le font pas (Kloepper *et al.*, 1989).

2.6- Les Rhizobactérie promotrices de la croissance des plantes

Le terme PGPR vient de l'anglais « Plant Growth Promoting Rhizobacteria », qui désigne des bactéries qui ont des effets bénéfiques sur la croissance et le développement des plantes de diverses manières (Ahmad *et al.*, 2013). Les rhizobactéries sont des bactéries ayant une forte capacité à coloniser les racines (schroth et hancock., 1982). Les bactéries non symbiotiques répondant à cette définition appartiennent à différents genres et espèces, parmi lesquels les plus étudiés sont : *Agrobacterium radiobacter*, *Azospirillum spp*, *Bacillus spp*, *Pseudomonas spp* fluorescent (Lemanceau., 1992).

2.6.1- Mécanismes impliqués dans la stimulation de la croissance des plantes par les PGPR

Plusieurs interactions, qu'elles soient bénéfiques (symbiose) ou néfastes (pathogénèse), sont observées entre les plantes, les bactéries du sol et les champignons qui permettent à l'activité biologique du sol de s'épanouir. (Emiliy, 2015). Les PGPR affectent directement ou indirectement la croissance des plantes à travers une variété de mécanismes. Ces bactéries sont capables de coloniser efficacement les systèmes racinaires et d'avoir des effets bénéfiques sur les plantes en stimulant la croissance des plantes et/ou en les protégeant des phytopathogènes (Haas et Défago., 2005).

- Mécanisme directe

Les modes directs comprennent la fixation de l'azote atmosphérique, l'apport de nutriments indisponibles (phosphore et autres nutriments minéraux), la production de régulateurs de croissance des plantes (auxines, cytokinines et gibbérellines) et l'inhibition de la synthèse d'éthylène (Antoun et Prévost., 2005).

- Mécanisme indirecte

Les mécanismes indirects sont l'élimination des phytopathogènes par la compétition pour l'espace et les nutriments, la synthèse d'enzymes hydrolytiques, l'inhibition de la production pathogène d'enzymes ou de toxines et l'induction de mécanismes de résistance des plantes (Antoun et Prévost., 2005).

2.7- Les interactions microorganismes-plantes

Interactions plantes-microorganismes il est largement admis que tout groupe microbien peut développer des fonctions importantes dans un écosystème (Giri *et al.*, 2005). Cependant, la plupart des études sur la microbiologie de la rhizosphère, en particulier celles décrivant les interactions synergiques plante-microorganismes, se concentrent uniquement sur les bactéries et les champignons. Par conséquent, cette revue se concentrera sur ces deux micro-organismes. Les bactéries et les champignons ont des habitudes nutritionnelles/de vie différentes, et diverses relations saprophytes ou symbiotiques, qu'elles soient nocives (pathogènes) ou bénéfiques (mutuelles), ont été rapportées (Kobayashi et Crouch, 2009). Les micro-organismes nuisibles comprennent les principaux agents pathogènes des plantes ainsi que les organismes nuisibles parasites et non parasites de la rhizosphère. Les bactéries et champignons saprophytes bénéfiques favorisent la croissance et la santé des plantes. Les symbiose bénéfiques pour les plantes comprennent les bactéries fixatrices d'azote et les champignons mycorhiziens (barea *et al.*, 2005) (figure 11).

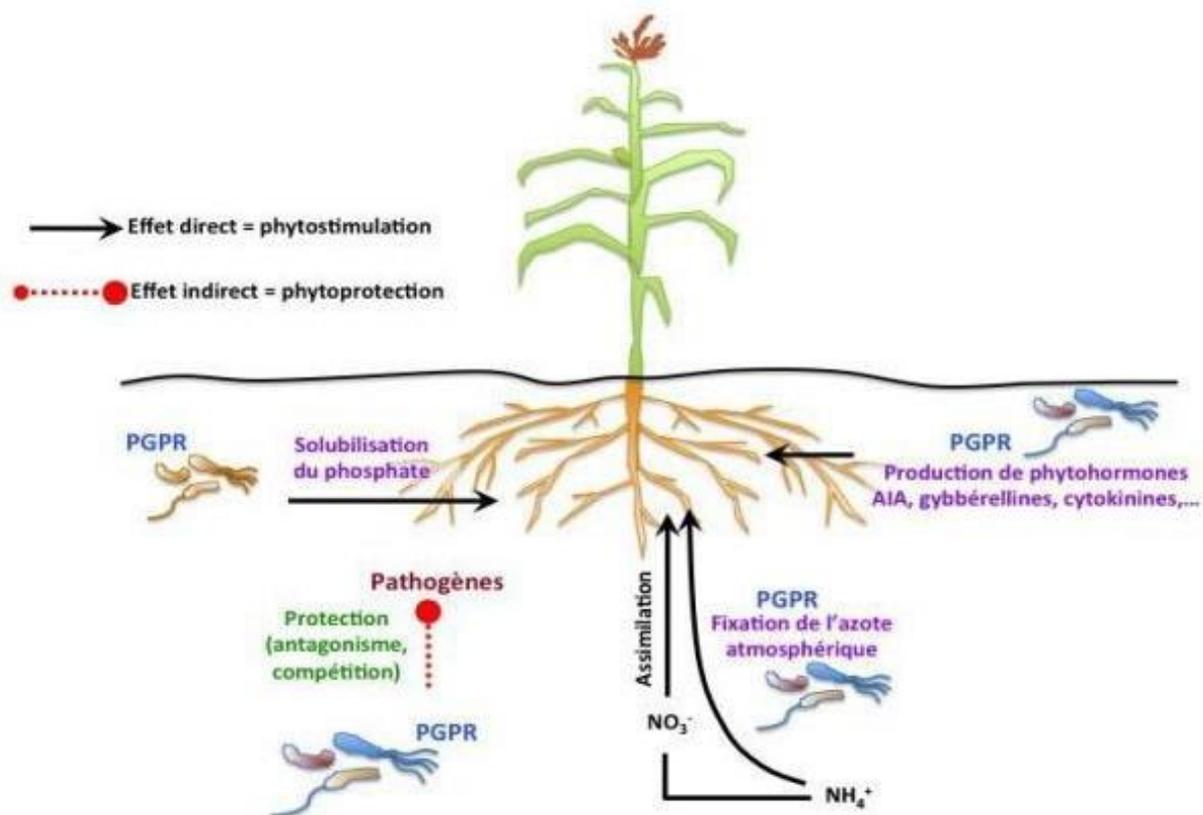


Figure 11 Schéma représente l'interaction entre les plantes et les microorganismes dans la rhizosphère (khan *et al.*, 2009)

*Matériel et
méthodes*

3- Matériel et méthodes

Actuellement en Algérie la lutte chimique est la seule moyenne utilisée pour lutter contre les maladies phytopathogènes, alors il est nécessaire de trouver de nouvelle méthode de traitement contre ces maladies provoquées par des moisissures qui causent des pertes graves en rendement dans le domaine de l'agriculture. Cependant, entant que biotechnologue le choix d'un milieu alternatif à base d'Azolla, disponible et moins chère a été effectué comme source de carbone et d'azote pour la production. De ce fait, le présent travail consiste à isoler des bactéries du genre de *Bacillus* à cause de leur capacité de résistance dans des conditions défavorables à partir de la zone de la rhizosphère de l'épinard. En outre, le choix de cette dernière a été réalisé grâce à de leur richesse en microorganismes bénéfiques et qui ont une activité antagoniste sur les agents phytopathogènes. Enfin, un essai de bio contrôle a été réalisé sur la tomate.

3.1- Isolement de l'agent phytopathogène

Les échantillons de plantes d'épinards présentant des symptômes ont été prélevés à partir de la région Ain ben Sbaa situé à Hamma Bouzian (Constantine, Figure 12).



Figure 12 Localisation géographique de la région de Ain Ben Sbaa, Hamma Bouzian (Constantine).

3.1.1- Isolement

L'isolement des agents phytopathogènes a été réalisé à partir des feuilles présentant des symptômes de maladies (figure 13). Les feuilles ont été lavées dans l'eau courante du robinet pour éliminer les débris et les autres contaminants. Les parties de plantes malades ont été coupées en petits morceaux (environ 5-10 mm), qui ont été stérilisés en surface avec l'hypochlorite de sodium à 1 % pendant trois minutes avant d'être brièvement lavées dans de l'eau distillée stérile et séchées sur papier filtre stérile devant le bec bunsen. Les morceaux séchés ont été placés sur milieu PDA (Annexe 1) et incubés à 30°C (Abbasher et al., 1998).



Figure 13 Les feuilles d'épinard présentant des symptômes de maladies.

3.1.2- Purification

L'opération a été effectuée dans le milieu PDA à pour but de faciliter l'identification des champignons. Les fragments ont été prélevés avec une anse de platine stérile et déposés sur de nouvelles boîtes de Petri. Les boîtes ont été incubées à 30°C pendant 7 jours (botton *et al.*, 1990).

3.1.3-Identification de l'agent phytopathogène

L'identification des isolats fongiques est basée sur des études macroscopiques et microscopiques (Rappily, 1968).

➤ Observation macroscopique

Il est nécessaire de caractériser ces isolats sur milieu PDA par l'aspect de colonies qui sert de critère essentiel d'identification à l'œil nu champignons filamenteux, il se forme des colonies cotonneuses, veloutées, poudreuses, ou granuleuses. La couleur des colonies est un facteur d'identification essentiel. Les couleurs les plus courantes sont le blanc, le crème, le jaune, l'orange, le brun et le noir. Les pigments peuvent être modifiés (Botton *et al.*, 1990).

➤ **Observation microscopique**

L'identification du genre fongique est basée sur la structure du mycélium (cloison ou non cloisonné), le type des spores, leur forme et leur couleur. L'examen microscopique d'une colonie fongique se fait après réalisation d'un étalement entre lame et lamelle, l'examen à l'objectif 40 est suffisant pour mettre en évidence la plupart et des éléments importants (Chabasse, 2002).

3.1.4- Conservation

La conservation des isolats fongiques a été réalisée dans des tubes à essais contenant (glycérol 30 % + eau distillée 70%) et le stockage a été effectué à -80°C (Tindall, 1992).

3.1.5- Teste de phytopathogénicité de l'isolat fongique

Les agents phytopathogènes inoculés sur milieu PDA pendant 10 jours ont été utilisés pour préparer la suspension sporale qui a été préparée par l'ajout de 20 mL d'eau distillée stérile sur chaque boîte de PDA (Hariprasard et Niranjana, 2008). Ensuite, la surface de chaque culture portant des conidies a été grattée avec pipette Pasteur. La solution de spores obtenue a été vortexée pendant une minute et ajustée à une concentration de 10^8 spores/mL, puis pulvérisée sur les parties aériennes des plantes à l'aide d'un pulvérisateur (Bahous *et al.*, 2008), et les pots ont été recouverts de sacs en polyéthylène. Après 48 heures, retirez le sac et placez le pot dans la serre. La maladie a été notée après un séjour de 20 jours (Sallam *et al.*, 2012).

➤ **Calcul de la sévérité de la maladie**

La gravité de la maladie a été enregistrée et notée à chaque traitement selon l'échelle de notation proposée par Latha *et al.* (2009), dans ce cas : 0=sain ; 1=1-5 % ; 2=6-10 % ; 3=11-25 % ; 5=26-50 % ; 7=51-75 % et 9 = 76 % de surface foliaire infectée.

➤ **Ré-isolement de l'agent pathogène**

Afin de confirmer que les symptômes observés après inoculation de l'agent pathogène s'agissent bel et bien de ceux provoqués par cet agent, un ré-isolement a été réalisé sur milieu PDA, puis comparé avec la culture initiale.

3.2-Isolement de l'agent antagoniste

La zone de la rhizosphère est très importante, elle constitue un réservoir naturel de microorganismes. De plus, le genre *Bacillus* est largement utilisé pour augmenter le rendement des cultures agricoles. De ce fait, les bactéries antagonistes de ce travail ont été isolées à partir du sol de la zone de la rhizosphère des plantes cultivées dans des champs agricoles.

3.2.1-Echantillonnage

Les échantillons (figure 14) de ce travail ont été prélevés à partir de la rhizosphère d'une plantule d'épinard de la région de Dababya situé à Hamma Bouziane (Constantine, Figure 15).



Figure 14 Le champ de prélèvement des échantillons situé à Dababya de Hamma Bouziane (Constantine).

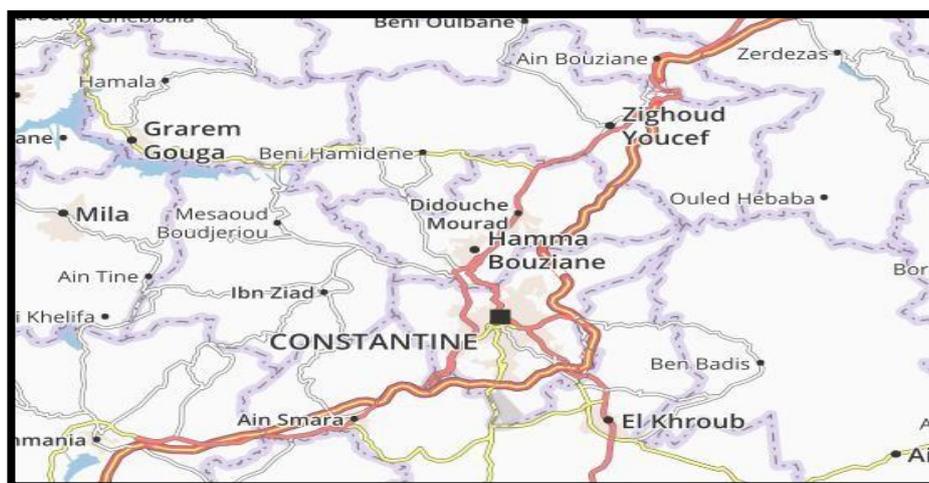


Figure 15 Localisation géographique de la région Dababya, Hamma Bouzian (Constantine).

La technique d'échantillonnage consiste à prélever une partie du sol rhizosphérique. Après avoir retiré 20 centimètre de la couche superficielle du sol (Timsit, 1992), 20 g du sol ont été prélevés à partir d'une profondeur de 20 cm. Les échantillons ont été placés dans des sacs en plastiques individuels et transportés au laboratoire dans une glacière (Salvador, 2005).

3.2.2-Isolement des bactéries du genre *Bacillus*

L'isolement de *Bacillus* a été réalisé par l'utilisation de méthode de dilution. En effet, la première étape consiste à la préparation de la solution mère SM, 1g du sol de la zone de la rhizosphère a été placé dans un tube à essais contenant 9 mL d'eau physiologique stérile. En effet, le tube a été agité pendant 20 min. Cette dernière nécessite une série de dilutions décimales (1 mL dans 9 mL d'eau physiologique), à l'aide d'une micropipette stérile, faire une dilution initiale en transférant 1 mL de SM dans un tube contenant 9 mL de l'eau physiologique stérile. A l'aide d'une nouvelle embouche, transférer 1 mL de la première dilution dans un autre tube. D'autres dilutions décimales sont donc préparées jusqu'à 10^{-4} (figure 16). Chaque tube de dilution a été vortexer avant de passer à la dilution suivante (ISO, 2017).



Figure 16 Une série de dilution décimale.

Ensuite, les solutions obtenues ont été traitées thermiquement à 80°C pendant 10 minutes. Ce traitement thermique permet d'éliminer toutes les formes végétales et restauration de la flore de spores. Par la suite, ensemençer $100\ \mu\text{L}$ de chaque dilution traitée à la surface du milieu gélosé nutritive (Annexe 1). Les boîtes ont été ensuite incubées à 37°C pendant 24 heures, toutes les flores de spores, aérobies et anaérobies facultatives ont été récupérées

(Vijayalakshmi et al., 2012) Cela correspond aux différentes bactéries qui forment des endospores (bactéries formant des endospores), y compris le genre *Bacillus*.

3.2.3-Purification

Après avoir isolé la souche, la purification qui est une étape très importante et très délicate, qui prend beaucoup de temps car c'est un échantillon contenant des milliers de micro-organismes, et nos expériences dépendront de sa pureté. Après la première inoculation sur les boîtes de Pétri, différentes colonies ont été obtenues, chaque colonie d'apparence différente a été ensemencée séparément. Incuber les boîtes ensemencées à 37°C pendant 24 heures. La purification des souches a été réalisée par des sous-cultures successives en milieu solide gélose nutritif (GN) jusqu'à l'obtention de colonies de même aspect et couleur dans les boîtes de Pétri (Botton *et al.*, 1990).

3.3-La sélection d'un agent antagoniste ayant une activité antifongique

Les isolats de *Bacillus* ont été testés sur des boîtes de Pétri de milieu de gélose au dextrose de pomme de terre (PDA) pour leur capacité à inhiber la croissance de divers champignons phytopathogènes (Thonart, 2013). Ce teste a été étudié selon la méthode de confrontation par contact direct sur milieu de culture. Cette technique consiste à placer dans la même boîte de Pétri contenant un milieu PDA, deux pastilles gélosées (6 mm de diamètre), l'une portant l'agent phytopathogène et l'autre l'agent antagoniste. Les deux pastilles ont été placées suivant un axe diamétral à 3 cm et à équidistance du centre de la boîte (figure 17). Le repiquage a été effectué en même temps. L'incubation a été réalisée à 30°C pendant dix jours (Hibar, 2005). Le témoin négatif pour tester les souches fongiques en leur absence de bactéries (kumar, 2002).

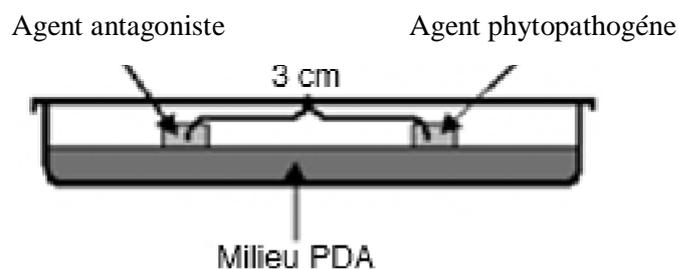


Figure 17 Confrontation entre l'agent phytopathogène et l'agent antagoniste par contact direct sur milieu PDA.

3.3.1- Etude microscopique de l'interaction

L'examen microscopique de l'interaction a été effectué par le prélèvement d'une quantité de mycélium d'isolat fongique en interaction avec la bactérie antagoniste, puis l'objet a été examiné entre lame et lamelle à l'objectif GX40. Et ce est suffisant pour mettre en évidence la plupart des éléments importants (Chabasse, 2002).

3.3.1- Pourcentage d'inhibition

La notation du diamètre moyen des colonies traitées est réalisée tous les jours pendant sept jours. L'évaluation de l'inhibition est estimée par le calcul du pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne selon la formule décrite par (Whipps, 1997).

$$I(\%) = (1 - D_n / D_o) \times 100$$

I(%) : représente inhibition moyenne de la croissance mycélienne

D_n : le diamètre moyen du champignon pathogène

D_o : le diamètre moyen du champignon témoin

3.4- Identification de microorganismes sélectionnés

Les microorganismes sélectionnés ont été identifiés par l'observation macroscopique, microscopique, et par des tests biochimiques.

3.4.1- Aspect Macroscopique

Cette étude est basée sur l'observation visuelle de la culture des isolats sur les boîtes cultivées et après incubation pour caractériser la taille, la forme, l'opacité, la consistance, la couleur et la viscosité des colonies sur le milieu solide.

3.4.2- Aspect Microscopique

Il a été effectué par une observation à l'état frais de bactérie pour détecter la mobilité et la forme des colonies, puis fixé et coloré par la méthode de Gram afin de déterminer leur morphologie et leur type de paroi (Tabak, 2011).

➤ A l'état frais

Pour examiner la mobilité des bactéries et la forme une fraction de colonie a été prélevée et incorporer progressivement dans la goutte d'eau qui a été déposée sur une lame, puis recouvrir la lame par une lamelle en évitant les bulles d'air.

➤ **Observation par coloration**

Cette étude consiste à réaliser un frottis, et la préparation de ce dernier constitue deux étapes : tous d'abord déposer une goutte d'eau distillé sur une lame. Par la suite à l'aide d'une anse de platine prélever une colonie qui a été étalée jusqu'à l'obtention d'une mince couche homogène (3/4 de la lame), puis la deuxième étape passé le frottis sur le bec benzène 3 à 4 fois une demi sec c'est le séchage et la fixation.

- **Coloration simple**

Après avoir le frottis, le bleu de méthylène a été déposé sur la lame pendant 1 min puis rincé avec de l'eau distillé et séché à l'aide d'un papier absorbant.

- **Coloration de GRAM**

Après la préparation de frottis, la lame a été placée sur un objet et colorée avec du violet du gentiane pendant 1 minute avant d'être rapidement rincée à l'eau courante, traitée pendant une minute avec une solution de lugol, puis rincée à nouveau par l'eau distillée . La lame colorée est ensuite soumise à une étape de décoloration en étant traitée avec de l'éthanol à 95%. C'est le moment de l'étape critique : maintenir le boiteux couché et couler le solvant sur les frottis pendant 2 à 3 secondes, ou jusqu'à ce que le colorant cesse de s'échapper librement des frottis. elle est ensuite immédiatement trempé dans l'eau courante. À ce stade, les cellules à Gram- seront décolorées, tandis que les cellules à Gram+ seront violettes. Le frottis est ensuite soumis à une coloration de 1min contre la Fuchsine pour le colorer (Singleton, 1999).

3.4.3- Test biochimique

- **Recherche de la catalase**

La catalase est une enzyme présente dans la plupart des bactéries strictement aérobies et anaérobies facultatives. La recherche de catalase est faite selon le protocole suivant : a l'aide d'une pipette Pasteur, une goutte d'eau oxygénée a été déposée au milieu d'une lame en verre propre et dégraissée, à l'aide d'une pipette bouton, des échantillons issus d'une culture pure pendant 18 heures ont été déposés sur le peroxyde d'hydrogène (Marchal *et al.*, 1982). La libération de bulles d'air indique la présence de catalase. Si aucune bulle n'est libérée, la catalase n'est pas présente

- **Test du mannitol mobilité**

Le milieu mannitol mobilité permet de détecter la fermentation du mannitol et la mobilité des bactéries étudiées. Pour ce faire, à l'aide d'une anse de platine les tubes ont été ensemencés par piqure centrale dans la gélose en culot, jusqu'au fond et incubés à 37°C pendant 18 à 24 heures (Frenry *et al.*, 2007).

- **La galerie API 20**

Le système API® BioMérieux (Appareillage et Procédé d'Identification) il s'agit d'une version miniaturisée et standardisée des techniques biochimiques. Etant donné qu'il existe un test biochimique commun entre la galerie Api 20 E et la galerie Api 50 CH et la disponibilité d'Api 20 E La sélection des souches a été réalisée avec cette dernière. L'identification biochimique a été menée par une galerie classique, qui a regroupé les tests du glucose et du lactose, du citrate, du mannitol-mobilité-nitrate et du test de l'urée-indole (Marie Koua et al, 2018).

➤ **Principe**

La galerie API 20 E comporte 20 micro-tubes contenant des substrats déshydratés. Les micro-tubes ont été inoculés avec une suspension bactérienne qui reconstitue les tests. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs. La lecture de ces réactions a été réalisée à l'aide du tableau de lecture. Cependant, l'identification a été effectuée à l'aide du Catalogue Analytique ou d'un logiciel d'identification.

3.5- Détection des enzymes de dégradation de la paroi fongique

La révélation de l'activité enzymatique de souche performante a été effectuée qualitativement et peu quantitativement en l'occurrence : Activité amylolytique, activité lypolytique, activité chitinolytique, activité protéolytique. En effet, cette étude a été réalisée pour voir la capacité de la souche de produire les enzymes de dégradation de la paroi fongique afin de l'utiliser dans le domaine de bio contrôle pour lutter contre les agents phytopathogènes fongiques.

3.5.1- Activité amylolytique

Ce test a été réalisé en faisant croître la souche sur une gélose nutritive contenant 1 % d'amidon. La culture a été incubée dans une étuve à 37 °C pendant 48 h. Ainsi, l'hydrolyse de l'amidon est mise en évidence par l'apparition de zones claires autour des colonies, en revanche, un résultat négatif se traduit par une coloration brune autour de la culture (Itsouhou et al., 2020).

3.5.2- Activité lypolytique

On fait tous d'abord un test de précipitation pour détecter la production des lipases et des estérases, en utilisant un milieu de culture de base additionné de Tween 20 et Tween 80 respectivement. Cette méthode est basée sur le principe de la précipitation du sel de calcium. L'hydrolyse du tween libère des acides gras qui se lient au calcium dans le milieu pour former des cristaux insolubles autour du point d'inoculation. Le Tween 80 est utilisé pour la détection des lipases car il contient des esters d'acide oléique, tandis que le Tween 20 est utilisé pour les

estérases car il contient des esters d'acides gras à chaîne inférieure. Les bactéries à tester sont inoculé sur un milieu de culture composé de : 10 g de peptone, 5 g de NaCl₂, 0,1 g de CaCl₂.2H₂O, 20 g d'agar et 10 ml (v / v) de Tween 20/80. Après incubation à 37 °C pendant 2 à 4 jours, une précipitation blanche autour de bord de la colonie indique une activité lipasique ou estérasique (Ramnath *et al.*, 2017).

3.5.3- Activité chitinolytique

Les chitinases sont des hydrolases qui attaquent les liaisons glycosidiques des molécules de chitine. Plus précisément, ils hydrolysent les liaisons (1→4)-β des résidus n-acétyl-β-d-glucosamine présents dans la chitine et la chitodextrine (jollès et muzzarelli, 1999). L'activité chitinolytique des souches antagonistes a été évaluée sur des boites de Pétri contenant le milieu chitine-agar (CA) et incubées à 30 °C pendant 5 jours après inoculation des disques au centre. Cependant, la largeur de chaque halo clair autour de souche antagoniste a été mesurée et enregistrée comme indicateur de l'activité chitinolytique (nihorimbere *et al.*, 2013).

3.5.4- Activité protéolytique

Dans cette étude, un milieu de culture contenant du bouillon nutritif (8 g), glucose (1 g) et de l'agar (18 g), pH 7,4 a été préparé. Puis, l'autoclavage de 15 mL du lait écrémé ont été réalisé séparément et ajouté au milieu. Les bactéries ont été ensuite inoculées sur ce milieu, après une période de croissance de 72 heures à 30°C. La présence d'un halos clairs autour des colonies signifie une production de protéase (Carrim *et al.*, 2006).

3.6- Etude *in vivo* de l'effet de la souche bactérienne sélectionnée sur la tomate

A fin de vérifier la capacité de la souche bactérienne sélectionnée à améliorer la croissance de plante et de lutter contre les agents phytopathogènes un test de bio contrôle a été réalisé sur des plantules de tomate ramenées de la région de Tamallous. De ce fait, une suspension bactérienne de (10⁸ cellules/mL) a été préparée et comptée par la cellule de mallasses (Annexe 2). Cette suspension biologique a été appliquée sur les racines de plantules de tomates âgées de 5 semaines en les immergeant dans 10 mL de cette dernière. En effet, trois plantules ont été repiquées dans chaque pot contenant le sol et le terreau et arrosées tous les deux jours avec de l'eau du robinet (Mouria *et al.* 2012). Traitement par l'agent phytopathogène. Après 1 mois de repiquage et traitement l'étude statistique a été réalisée.

3.7- Fermentation en milieu alternatif à base d'Azolla

3.7.1- Ensemencement de *Bacillus* sur milieu solide à base d'Azolla

Azolla est une plante aquatique composée d'une tige courte, ramifiée et flottante, portant des racines qui pendent dans l'eau (Tran, 2015). Le genre *Azolla* contient 5 ou 7 espèces, et se place soit dans la famille des Salviniacées, soit dans la famille des Azollacées.

À un intérêt dans l'agriculture principalement en Asie, elle est utilisée pour l'alimentation d'animaux (poissons, porcs, volailles). L'un des avantages les plus importants c'est la faciliter de récolte et aussi elle doubler sa taille tous les jours dans les conditions favorables pour leur croissance. À cause de sa richesse en élément intermédiaire de croissance (calcium, phosphore, potassium et fer), et elle a aussi un teneur élever en protéine, la plante a été utiliser dans cette étude.

Avant de passer au milieu de fermentation, un milieu de culture solide à base d'Azolla a été effectué. La préparation du milieu consiste de mettre 20 g d'Azolla sèche dans un bécher contenant 500 mL d'eau distillé puis le met sur plaque chauffante (Wisd), le milieu a été chauffer jusqu'à l'ébullition. Puis récupérer l'eau dans un autre bécher et ajouter 8g d'agar avec un indicateur de pH et qui est le rouge de phénol, ensuite placer le bécher dans un agitateur magnétique pour l'homogénéisation du milieu. Enfin le mélange a été stérilisé à 120°C pendant 20 min.

Une fois le milieu a été stérilisé, il doit être coulé dans les boites de Pétri devant le bec bunsen. Puis la bactérie a été ensemencée dans le milieu et incubée pendant 24h à 37 °C.

➤ L'observation microscopique

Pour examiner la mobilité des bactéries et la forme, une fraction de colonie a été prélevée et incorporée progressivement dans la goutte d'eau qui a été déposée sur une lame, puis recouvrir la lame par une lamelle en évitant les bulles d'air.

3.7.2- Production sur milieu liquide

Afin de produire la biomasse de la souche bactérienne obtenue et d'analyser les métabolites sécrétés une fermentation a été réalisé. En effet, deux milieux ont été utilisés, deux milieux ont été déjà utilisés et qui sont : milieu optimum et milieu landy (Akpa, 2001) et un milieu proposé et qui est milieu d'Azolla, et ce a été utilisé comme source de carbone et d'azote. Pour cela, tous les milieux de culture ont été mis dans des erlenmeyers de 250 mL fermées avec des bouchons préparés du coton cardé et la gaze et stérilisés à 120°C pendant 15 min. Après inoculation, la température est maintenue constante à 37 °C dans toutes les fermentations.

➤ **Préparation de la pré-culture**

La préparation de l'inoculum est basée sur le travail de Dulmage, 1990. La pré-culture a été réalisée en deux étapes. En premier lieu, un erlenmeyer de 250 mL contenant 50mL d'un milieu landy (Annexe 1) a été inoculé par quelques colonies de la bactérie prises stérilement, après 12 h d'incubation à une vitesse d'agitation de 130 rpm, 1mL de pré-culture a été transféré pour inoculer un autre erlenmeyer de 250 mL contenant 50 mL, de milieu landy qui sera incubé dans les mêmes conditions pendant 72 h formant ainsi l'étape de fermentation (Akpa, 2001).

➤ **Préparation de milieu alternatif**

Avant de lancer la fermentation la préparation de milieu alternatif a été effectuée à base d'Azolla, et ce a été utilisée comme source de carbone et d'azote au lieu d'utilisé le glucose et le acide L-glutamique en milieu landy. De ce fait, Azolla a été poussée dans des étangs recouverts de plastique avec 2 cm de terre, de terreaux et 5 cm de l'eau. Après 2 à 3 semaines des tapis denses ont été formés. Par la suite, en mettre la plante dans un tissu propre et laisse la sécher à l'aire libre. Puis la quantité sèche de 40g a été broyée et transférée dans un bécher contenant 1000 mL d'eau distillée.

➤ **Inoculation de milieu de fermentation**

1mL de pré-culture a été transféré pour inoculer un autre erlenmeyer de 250 mL contenant 50 mL de milieu Azolla qui sera incubé dans les mêmes conditions du pré-culture pendant 72 h formant ainsi l'étape de fermentation.

➤ **Les méthodes analytiques**

Cette étape consiste à mesurer la biomasse par plusieurs méthodes en l'occurrence : l'évaluation du nombre de cellules dans le milieu à l'aide de cellule de Mallassez ; calcul de la matière sèche et le mesure de la densité optique de biomasse dans le milieu. Et aussi, la mesure de la densité optique de métabolites produits par la souche bactérienne obtenue au cours la fermentation.

1. Mesure du nombre de cellules

La détermination du nombre de cellules contenues dans un volume précis d'un milieu liquide a été réalisée par cellule Mallassez. En faite, La suspension a été agitée pour la rendre plus homogène puis à l'aide d'une micropipette 0,1 μm a été prélevé et déposé rapidement sur la cellule de Mallassez. Puis recouvrir d'une lamelle rigide que l'on pose fermement contre les deux zones de support de la cellule pour passer à l'observation par le microscope (objectif G, X40).

2. Mesure de la densité optique

La densité optique de la suspension bactérienne a été effectuée dans un spectrophotomètre à 600 nm (SHIMADZU). Le milieu de culture stérile sert de référence.

3. Détermination de la matière sèche cellulaire

Après homogénéisation de la culture bactérienne, 1 ml de suspension a été filtrée sous vide à l'aide d'un filtre (Gelman Sciences) de 0,45 µm. Le retentât et le filtre ont été transférés dans un récipient en aluminium préalablement taré avec le filtre non utilisé (Pc). Le récipient a été placé dans un four à 104°C pendant 24 h avant d'être pesé à nouveau (Ps). La valeur de la matière sèche cellulaire est la différence entre Ps et Pc (Akpa, 2001).

$$MS = Pc - Ps$$

MS : la matière sèche

Pc : la masse du papier filtre non utilisé

Ps : la masse du papier filtre utilisé

4. Analyse des métabolites

L'analyse présomptive de surnageant obtenues à partir de la fermentation a été effectuée comme suite : les surnageants ont été filtrés sous vide à l'aide des filtres stériles de 0.2µm de diamètre. Les extraits obtenus ont été analysés par spectrophotomètre (Akpa, 2001).

3.8- Lyophilisation

La lyophilisation est une méthode utilisée afin de réaliser la conservation de substances, de cellules microbiennes et notamment de produits alimentaires et pharmaceutiques, elle consiste en une congélation rapide et une déshydratation totale du produit concerné, qui est ensuite conservé sous vide à la température ambiante. La biomasse obtenus, à partir de la fermentation de 3 jours ont été lyophilisés et transformés en poudre à l'aide d'un lyophilisateur.

Résultats

4- Résultats

Ce travail porte sur l'isolement de bactérie du genre de *Bacillus* à partir du sol de la zone de la rhizosphère de l'épinard, sélection et caractérisation d'isolats à effet antagonistes sur les agents phytopathogènes de l'épinard. De plus, un test *in vivo* a été réalisé sur des plantules de tomate pour vérifier la capacité de souche bactérienne obtenue de lutter contre les agents phytopathogènes. Enfin, une fermentation a été effectuée sur deux milieux de culture à savoir : milieu optimum et un milieu alternatif à base d'Azolla.

4.1- Isolement de l'agent phytopathogène

L'isolement de l'agent phytopathogène a été réalisé à partir des échantillons de plantes d'épinard présentant des symptômes de maladies fongiques. En effet, l'obtention de trois isolats fongiques a été réalisée à savoir : Alt1, Alt2, F.

4.2- Identification de l'agent phytopathogène

L'identification des agents phytopathogènes a été effectuée par l'observation macroscopique et microscopique des isolats fongiques obtenus.

4.2.1- Etude des caractères macroscopiques et microscopiques

Les caractères macroscopiques de l'isolat fongique Alt1 ont été étudiés sur milieu PDA après 7 jours de développement (Figure 18), en l'occurrence : une texture veloutée de couleur verdâtre; le verso de couleur noir; les bords sont blanches.

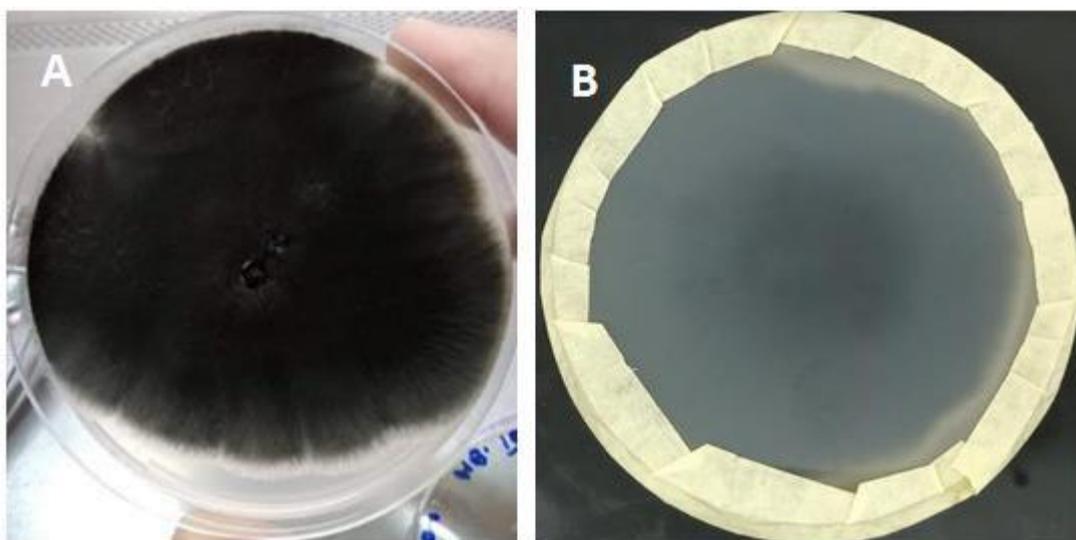


Figure 18 Aspect macroscopique de la colonie *Cladosporium sp* « Alt1 », A: recto, B:verso.

L'observation microscopique de l'isolat Alt1 a montré des spores en chaînes ramifiées globulaires, ovoïdes à cylindriques, septées, de couleur olive foncé (figure 19).

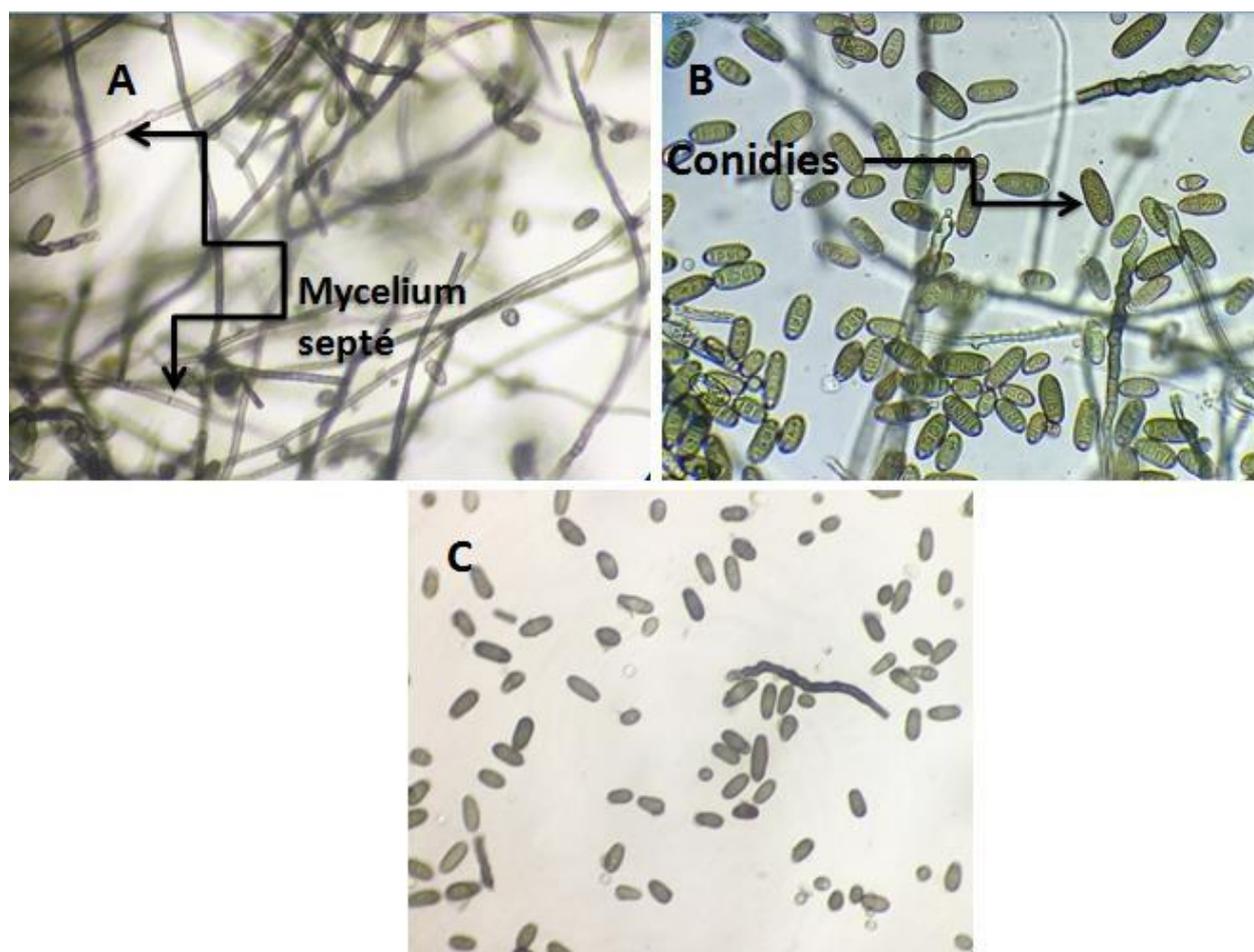


Figure 19 Aspect microscopique de la souche *Cladosporium sp.* « Alt1 »,
 A : représente un mycélium septé, B et C: conidies GX 40.

L'étude macroscopique et microscopique, confirment que l'isolat Alt1 appartient au genre *Cladosporium*.

Les caractères macroscopiques de l'isolat fongique Alt2 (Figure 20) ont permis de relever les caractères suivants : les colonies apparaissent cotonneuses grises olive et duveteuses et présentent une texture épaisse; le verso de couleur noir et le contour de moisissure est blanc.

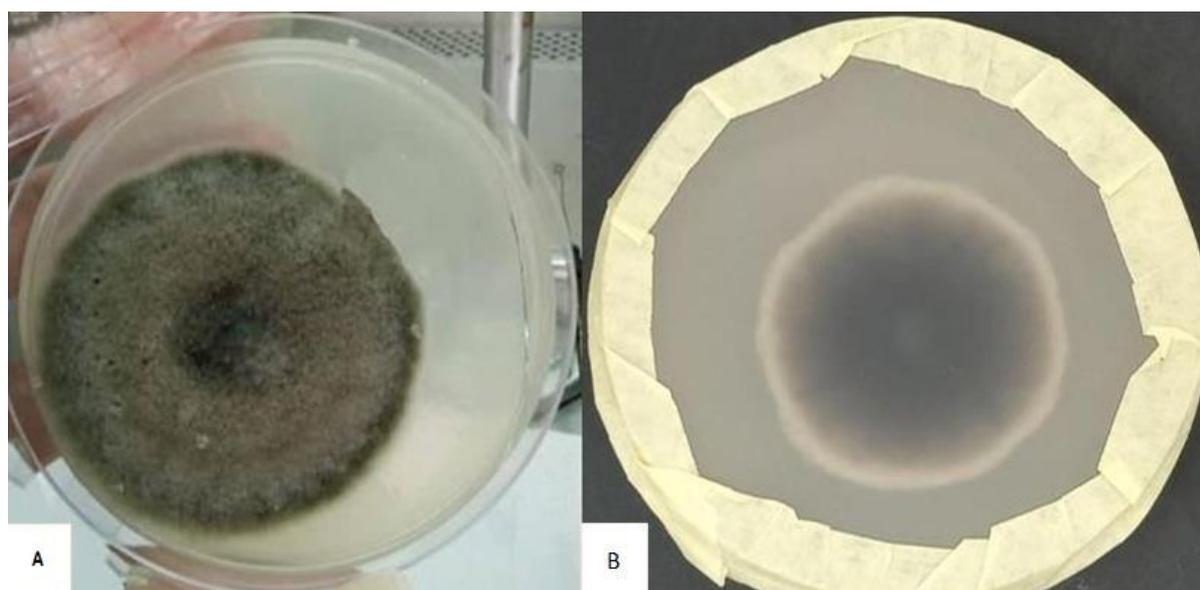


Figure 20 Aspect macroscopique de la souche *Alternaria sp.* « Alt2 », A: récto, B: verso.

L'observation microscopique (GX10 et GX40) de l'isolat Alt 2 a montré un mycélium cloisonné brun, et des conidies ovoïde pluricellulaires en chaînes, de forme cylindriques (figure 21).

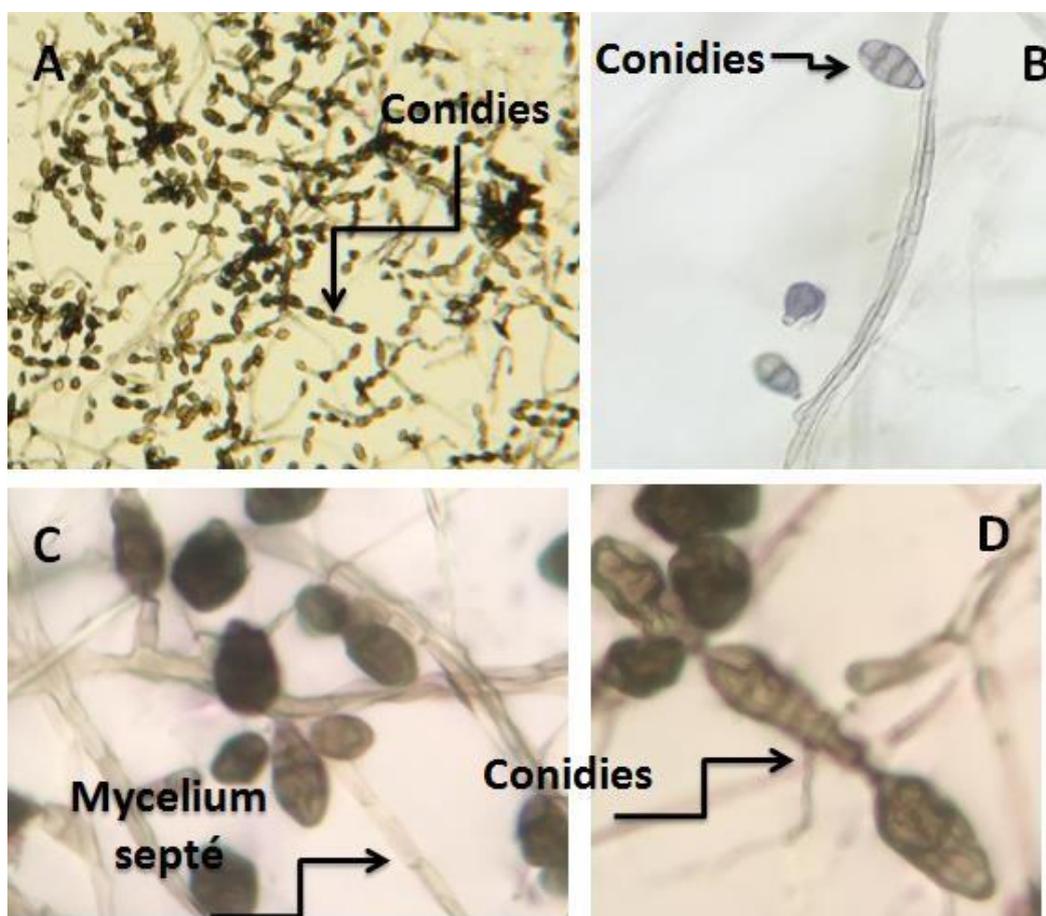


Figure 21 Aspect microscopique d'*Alternaria sp.* « Alt2 », A: conidies en chaînes GX10, B et D: conidies GX40, C: la forme du thalle septée GX40.

L'aspect macroscopique et microscopique montre que l'isolat fongique Alt 2 est *Alternaria sp.*
 Les caractères macroscopiques de l'isolat fongique F sont apparus comme suit : Mycélium de couleur blanc; cotonneux et épais; une face inférieure de couleur beige au centre et les bords sont blancs.

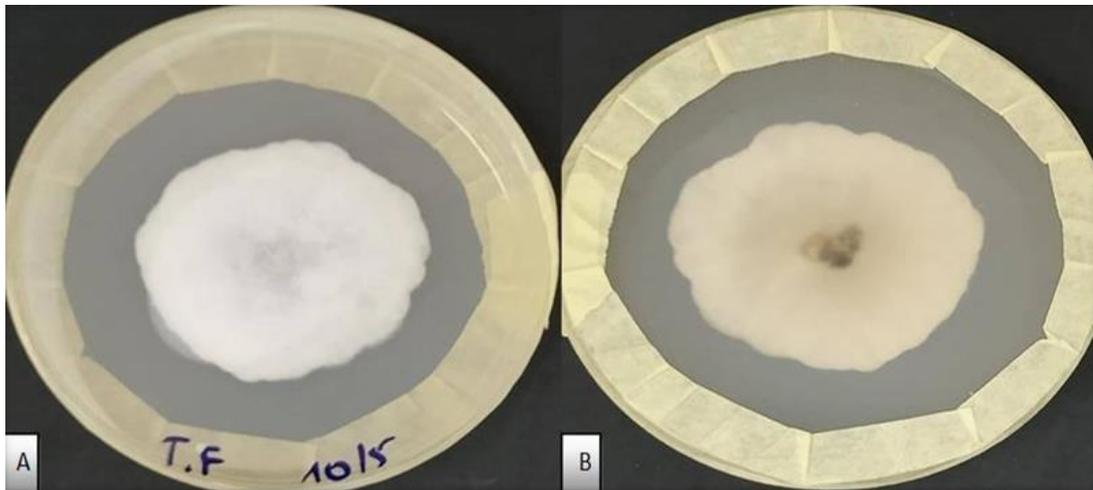


Figure 22 L'aspect macroscopique de la souche *Pythium sp.* « F », A: recto, B: verso

L'observation microscopique de l'isolat F a montrée un mycélium non cloisonnés et ramifiés, et des spores (conidies) rondes en chaines (figure 23).

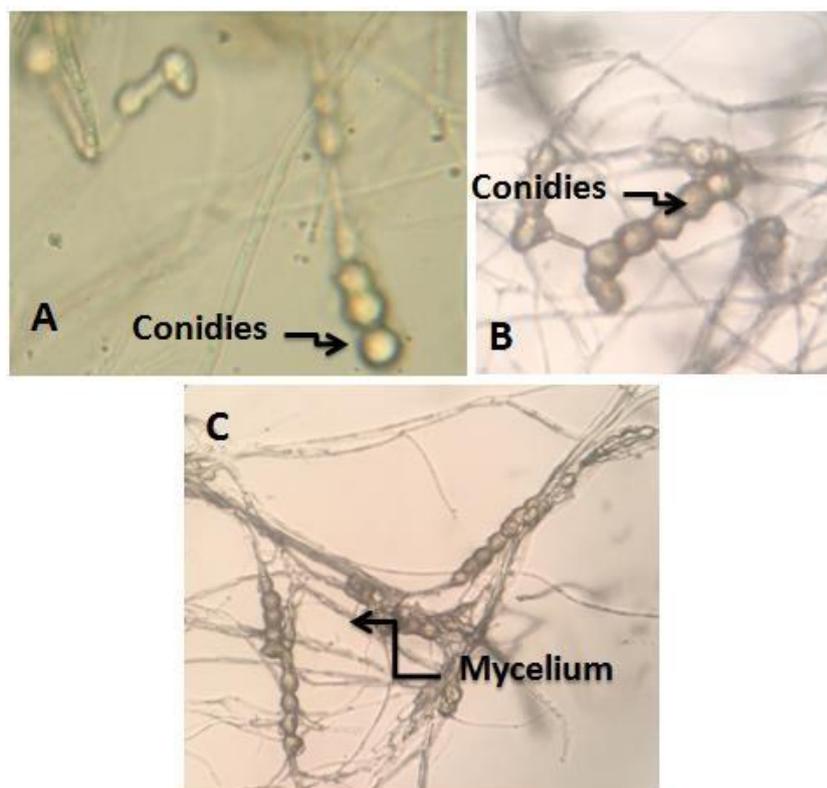


Figure 23 Aspect microscopique de la souche *Pythium sp.* « F », A et B conidies GX40, B: la forme du thalle non cloisonné GX40.

Le résultat de cette étude montre la présence des agents phytopathogènes, en l'occurrence: *Cladosporium sp.*, *Alternaria sp.*, et *Pythium sp.*, dans la région prospectée.

4.3- Test de phytopathogénicité

Cette étude a été réalisée pour confirmer l'effet pathogène des moisissures obtenues *Cladosporium sp.*, *Alternaria sp.*, *Pythium sp.*. Les plantules de la tomate ont été pulvérisées par la suspension sporale de chaque moisissure. En effet, après 1 mois la sévérité de la maladie a été noté (figure 24).

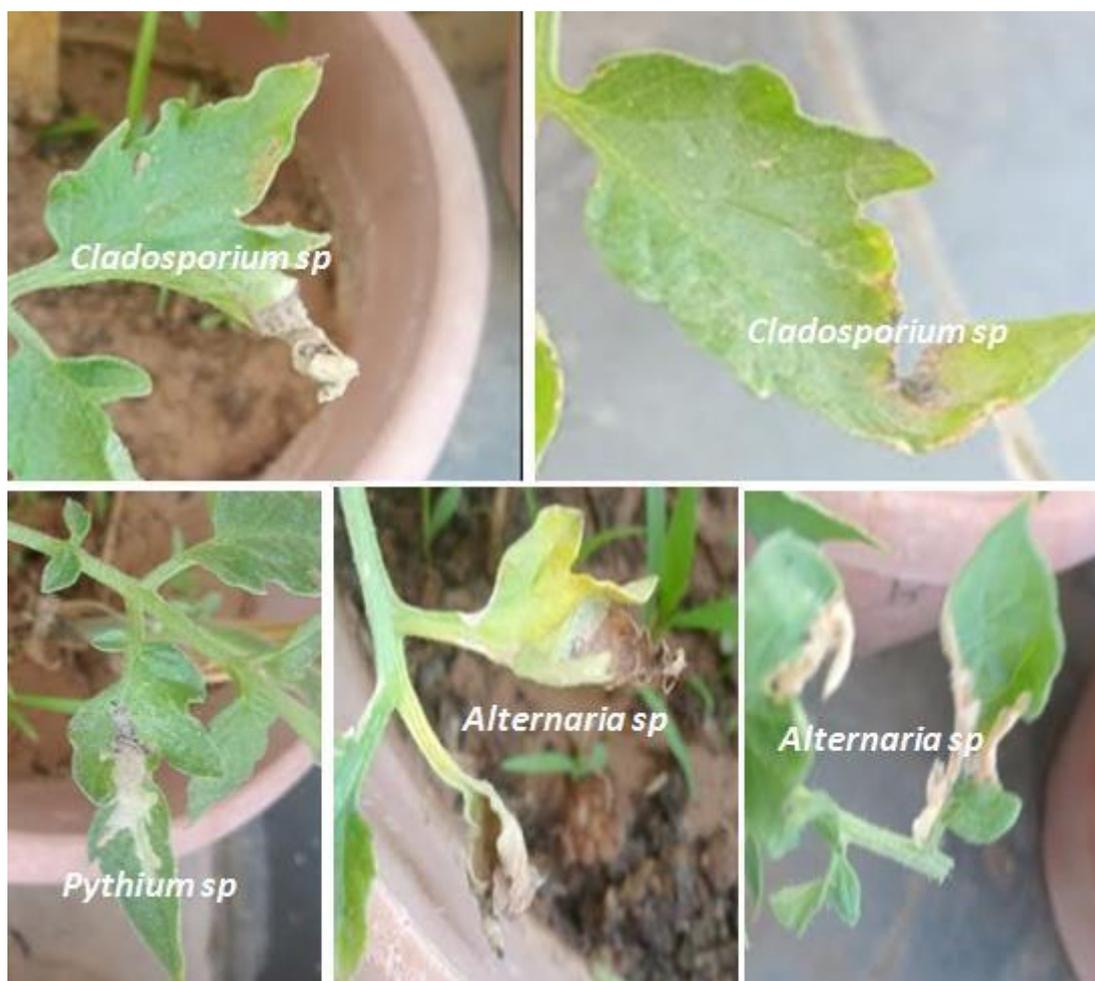


Figure 24 Test de pathogénicité de souches *Cladosporium sp.*, *Alternaria sp.*, *Pythium sp.* sur des plantules de tomate.

Le résultat illustré dans la figure 24 montre l'apparition des taches sur les feuilles de plantules de tomate après 1 mois d'inoculation.

4.3.1- Calcul de la sévérité de la maladie

Les pourcentages de sévérité ont été calculés après 1 mois d'inoculation. La valeur obtenue est de 76%, cela due à l'efficacité de la suspension sporale sur les plantes de tomate.

4.3.2- Ré-isolement de l'agent pathogène

Le ré-isolement a été effectué à partir des fragments de feuilles développant les symptômes précédents et ensemencés sur milieu (PDA). Après une semaine d'incubation à 30 °C, des moisissures sont développées autour des fragments des feuilles (figure 25), et sont similaire aux résultats précédents (figure 22 : Alt1, Alt 2, F).

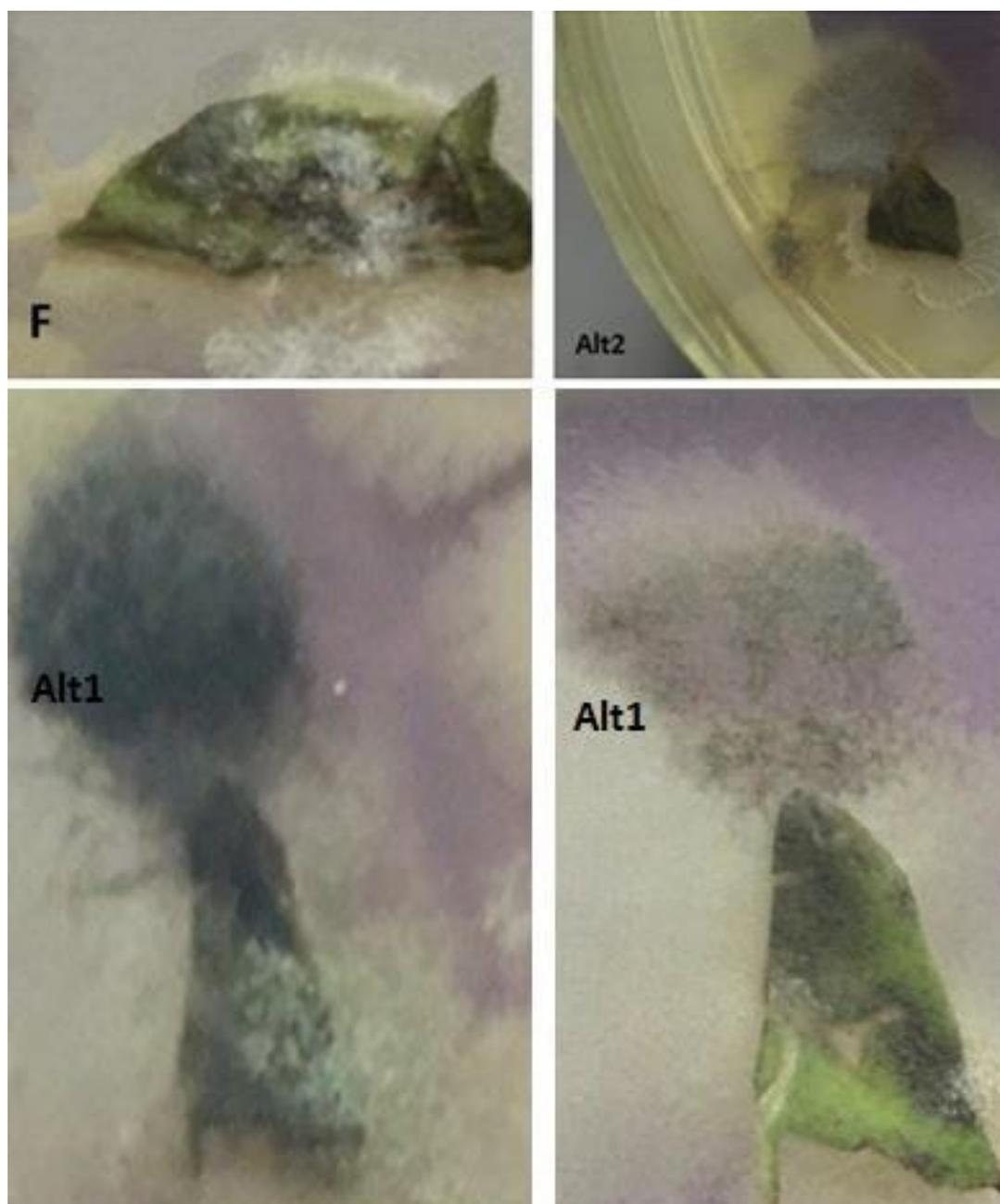


Figure 25 Aspect macroscopique des isolats fongiques Alt1, Alt 2, F après ré-isolement

4.4- Isolement de l'agent antagoniste

Douze isolats bactériens ont été obtenus à partir des échantillons du sol de la zone de la rhizosphère de l'épinard (figure 26).

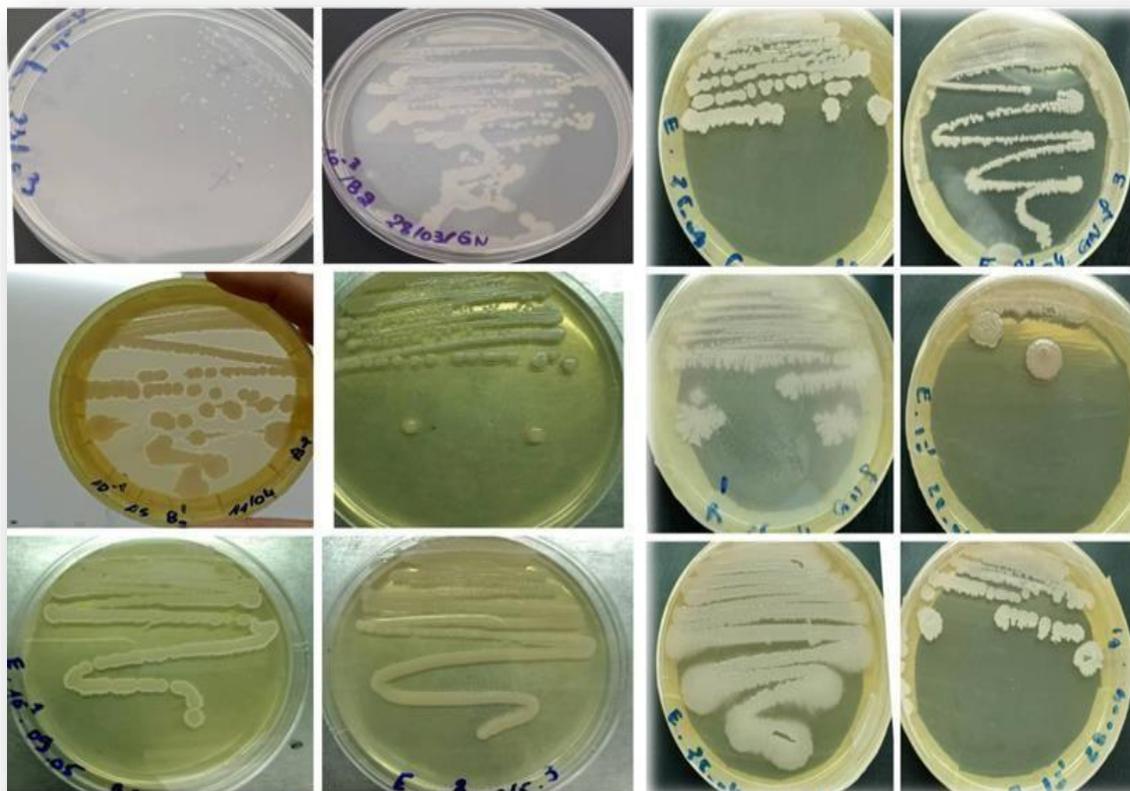
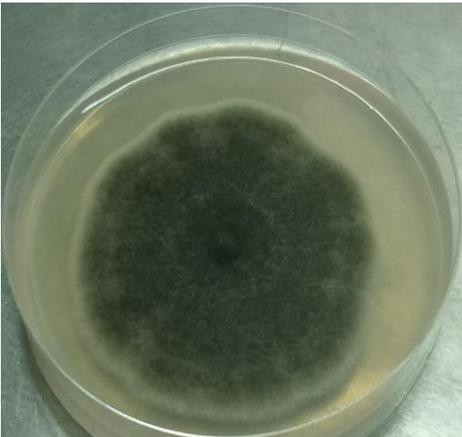
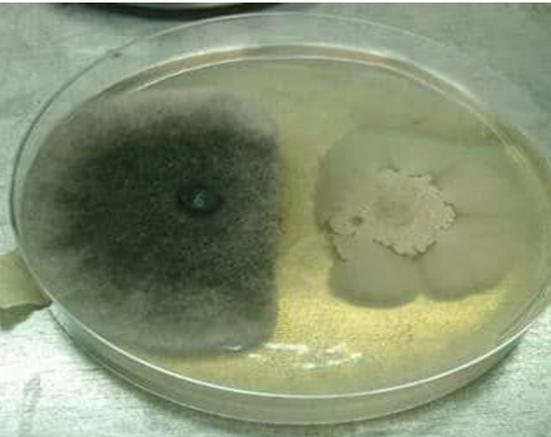


Figure 26 Isolats bactériens obtenus à partir du sol de la zone de la rhizosphère de l'épinard.

4.5- Sélection d'isolats à effet antagoniste

Parmi les isolats bactériens testés, une seule bactérie (B1) a un effet positif contre les moisissures phytopathogènes, à savoir : *Cladosporium sp.*, *Alternaria sp.*, *Pytium sp.* (tableau 2).

Tableau 2 Inhibition *in vitro* de la croissance de moisissures phytopathogènes par l'isolat antagoniste (B1) après 7 jours d'incubation.

	Témoin	Test antagoniste
B1 /Alt 1		
B1/Alt 2		
B1 /F		

Les figures illustrées ci-dessus dans le tableau 1 montrent que l'isolat B1 développe la plus importante zone d'inhibitions contre la souche d'*Alternaria sp.* Suivi par la souche de *Pythium sp.*, et enfin la souche de *Cladosporium sp.*

4.5.1- Évaluation du taux d'inhibition

Les résultats de cette expérience ont montré que le taux d'inhibition variait entre 48% et 58% selon les moisissures testées (tableau 3).

Tableau 3 Taux d'inhibition de la croissance fongique par confrontation direct.

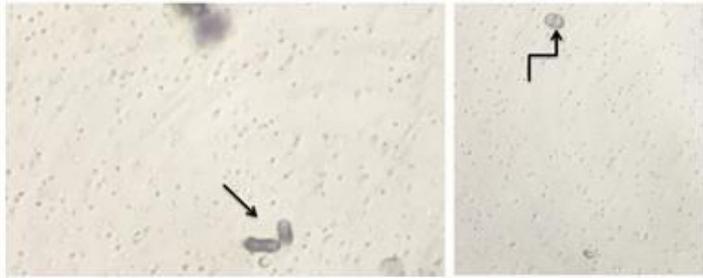
	Taux d'inhibition		
	<i>Cladosporium sp.</i> (Alt 1)	<i>Alternaria sp.</i> (Alt 2)	<i>Pytium sp.</i> (F)
B1	48,80 %	58,33 %	50 %

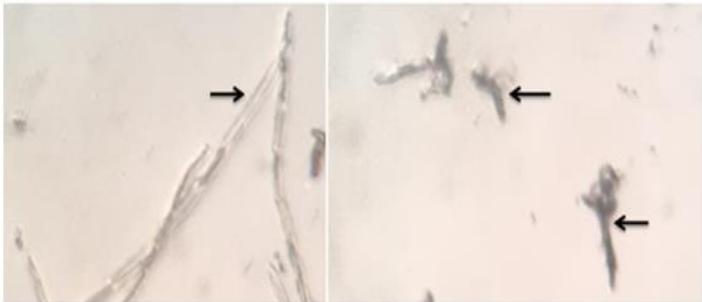
D'après le tableau ci-dessus on remarque que le meilleur taux d'inhibition est celui de l'isolat bactérien B1 sur *Alternaria sp* (58,33%), suivie de *Pytium sp* (50%). Tandis que le faible pourcentage d'inhibition de la bactérie antagoniste a été remarqué sur *Cladosporium sp* par une valeur de (48,80%).

➤ Etude microscopique de l'interaction

L'effet antagoniste de la bactérie B1 sur les agents phytopathogènes (*Alternaria sp.*, *Pytium sp.* et *Cladosporium sp.*) a été observé sous microscope, les figures illustrées dans le tableau 4 montrent que la bactérie a provoqué une dégradation au niveau du filament, ainsi on a constaté une pénétration de la souche antagoniste à l'intérieur de filament et de spore, et aussi provoqué une déformation des spores.

Tableau 4 Etude microscopique de l'interaction entre la bactéries et les isolats fongique

Isolats fongiques	B1	Observation
Alt1		Déformation des spores

<p>Alt2</p>		<p>Déformation des spores</p>
<p>F</p>		<p>Déformation des spores et dégradation de filaments</p>

4.6- Identification d'isolat bactérien antagoniste

L'identification de l'isolat bactérien obtenu a été effectué par : Observation macroscopique et microscopique et des tests biochimiques.

4.6.1- Observation macroscopique et microscopique

Les caractères macroscopiques d'isolat bactérien sélectionné B1 ont été étudiés sur milieu GNen l'occurrence: Les colonies sont moyenne environ de 4 mm; de forme irrégulier; lobé; de couleur crème; opaque à texture muqueuse (figure 27).



Figure 27 L'isolat bactérien sélectionné « B1 ».

L'observation microscopique à l'état frais montre que la bactérie est mobile, forme de petit bacille. En effet, l'observation par coloration de Gram montre que la bactérie est gram positive (figure 28).

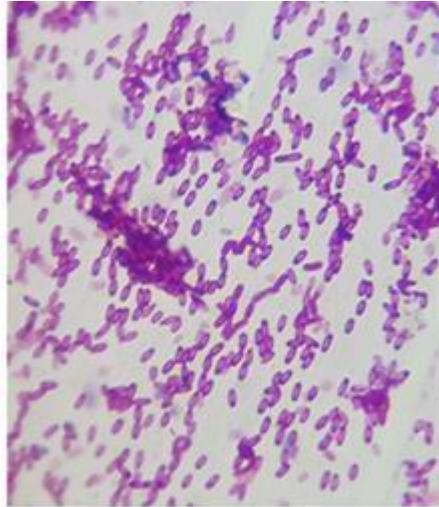


Figure 28 Observation microscopique de l'isolat bactérien (B1), GX40.

4.6.2- Test biochimique

Des tests biochimiques présomptifs ont été réalisés pour identifier l'isolat bactérien obtenu à savoir : Test de catalase; Test mannitol mobilité; La galerie API 20.

➤ Test de catalase

Le test de la catalase permet de vérifier si la bactérie possède l'enzyme de la catalase qui décompose le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). En effet, le résultat de ce test montre que la bactérie B1 est capable de produire cette enzyme (figure 29).



Figure 29 Test de catalase pour la bactérie B1.

➤ **Test mannitol mobilité**

Le milieu de mannitol mobilité permet l'étude de la fermentation de mannitol et la mobilité des isolats bactériens. La lecture de ce test est possible grâce à la présence d'un indicateur de pH et qui est le rouge de phénol. Le virage de couleur au jaune indique que il y a une acidification du milieu, le test a montré que la bactérie est mobile (figure 30).



Figure 30 Test mannitol mobilité.

➤ **La galerie API 20**

L'identification biochimique a été menée par une galerie classique, qui a regroupé les tests du glucose, du lactose, du citrate, du mannitol-mobilité-nitrate et du test de l'urée-indole. La figure 31 représente les résultats après 48h.



Figure 31 Résultats d'API 20 E après 48 h d'incubation A: témoin, B: résultats

Tableau 5 Test de la galerie API 20 E.

N	Test	Résultat
		B1
01	ONPG:2-nitrophenyl – BDgalactopyranoside	-
02	ADH: L-arginine	+
03	LCD: L- lysine	+
04	ODC: L – ornithine	+
05	CIT : Trisodium citrate	+
06	H2S : Sodium thiosulfate	-
07	UREE	+
08	TDA: L-tryptophane	+
09	IND: Production d'indole	+
10	VP: Sodium pyruvate	-
11	GEL: Gélatine (origine bovin)	+
12	GLU : D- glucose	+
13	MAN: mannose	+
14	INO: Inositol	+
15	SOR: D –sorbitol	-
16	RHA: L –rhamnose	-
17	SAC: D- saccharose	-
18	MEL: D-melibiose	-
19	AMY: Amygdaline	-
20	ARA: L- arabinose	-

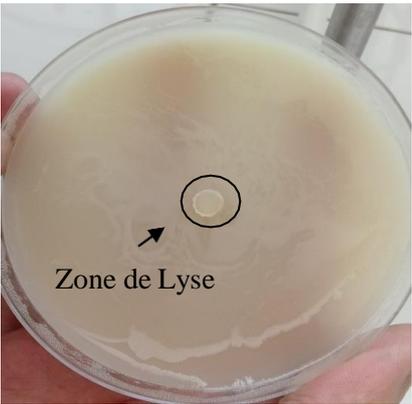
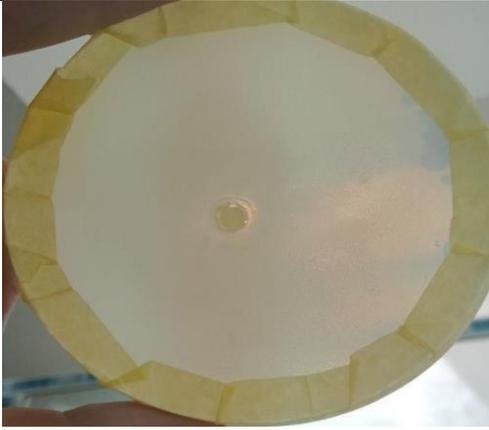
A partir de résultat illustré dans le tableau on conclue que la bactérie capable de fermenter D-glucose, mannose et aussi elle produise l'indole et utilise le citrate comme seule source de carbone. De plus, l'isolat bactérien B1 capable de produire l'enzyme uréase. Par contre elle n'a pas la capacité de fermenter le saccharose, le mélibiose et l'amygdaline.

À partir de l'examen macroscopique et microscopique, le test de thermo-résistance, les tests biochimiques, l'isolat bactérien B1 est appartient au genre de *Bacillus*.

4.7- Test enzymatique

Les tests enzymatiques ont été réalisés dans le but de déterminer la capacité de la souche obtenue à produire les enzymes nécessaires à la dégradation de la paroi cellulaire fongique, telles que: la protéase, la lipase, la chitinase et l'amylase (tableau 6).

Tableau 6 Détection de l'activité d'amylase, lipase, protéase, et de chitinase de la souche bactérienne B1

L'enzyme	Chitinase	Protease
		
L'enzyme	Lipase	Amylase
		

4.7.1- Activité chitinase

Après incubation de *Bacillus* à 37°C pendant 2 jours sur gélose, contenant la chitine colloïdale, la lecture a montré une zone d'hydrolyse violet sur la géloseensemencée par les souches de *Bacillus*.

4.7.2- Activité protéasique

L'activité protéasique de la souche de *Bacillus* a révélé la présence d'une zone d'hydrolyse sur milieu protéase en présence de la papaïne comme contrôle positif.

4.7.3- Activité amylolytique

La souche sélectionnée a la capacité d'hydrolyse l'amidon, détecté par l'apparition d'un halo transparent au tour de la colonie.

4.7.4- Activité lypolytique

Une précipitation blanche autour du bord de la colonie indique une activité lipasique.

4.8- Etude *in vivo* de l'effet de la souche sélectionnée sur la tomate

Le résultat de traitement des plantules de tomate par la suspension bactérienne *Bacillus sp* est présenté dans le tableau 7.

Tableau 7 Résultat du test *in vivo* après 1 mois de repiquage et traitement.

Variables	Témoin	<i>Bacillus</i>
La taille	24,2	27,2
Le nombre de feuille	53,4	70

Selon les valeurs illustrées dans le tableau ci-dessus on remarque une amélioration dans la croissance et une augmentation dans le nombre de feuille des plantules traités par la bactérie par rapport au témoin, ce résultat confirme l'effet promoteur et de stimulation de croissance de plantules de tomate.

Afin de vérifier l'efficacité de la bactérie *Bacillus* sur la protection des plantules de tomate vis-à-vis les agents phytopathogène étudiés, un test *in situ* a été réalisé (tableau 8).

Tableau 8 Effet du traitement sur des plantules de tomate par la souche de *Bacillus sp.* dans des conditions de pots après 1 mois de repiquage.

Variable	La moyenne					
	Alt1+Bacillus	Alt2+Bacillus	F+Bacillus	Alt1	Alt2	F
La taille	27,52	29,2	27,6	24	24,4	23,8
Le nombre de feuilles	70,2	79,6	74	61,8	74,4	74,2

L'influence du traitement bactérien testé sur les agent phytopathogène *Alternaria sp.*, *Pytium sp.* et *Cladosporium sp.*, a montré un effet positif sur la stimulation de la croissance (augmentation de la taille et de nombre de feuille de plantule), par rapport au témoin, de plus, on remarque que la bactérie avait un effet protecteur sur Alt 2 seulement.

4.9- Fermentation en milieu alternatif à base d’Azolla

4.9.1- Ensemencement de *Bacillus sp.* sur milieu solide à base d’Azolla

Afin de vérifier l’adaptation de la souche bactérienne sélectionnée sur milieu alternatif d’Azolla, l’ensemencement de cette dernière a été effectué sur milieu solide à base d’Azolla. En effet, après 24 heures d’incubation, la souche de *Bacillus sp.* est bien développée (figure 32). L’aspect macroscopique de colonie bactérienne est à texture muqueuse, opaque, de couleur beige.



Figure 32 L’aspect macroscopique de la souche *Bacillus sp.* sur milieu solide à base d’Azolla.

4.9.2- Production sur milieu liquide

Vu que l’importance de *Bacillus* dans la lutte biologique, Une fermentation a été réalisée pour tester un milieu alternatif à base d’Azolla. De ce fait, l’évaluation de la biomasse de la souche bactérienne sélectionnée *Bacillus sp.* a été effectuée sur deux milieux à savoir : milieu landy et milieu alternatif d’Azolla, à l’échelle du laboratoire dans des flacons erlenmeyer de 250 mL. La biomasse de la souche bactérienne a été évaluée quotidiennement pendant 72 h de fermentation. L’évaluation a été effectuée pour la concentration de la biomasse et des métabolites produits par la bactérie.

4.6.1- Dénombrement de cellules

Le dénombrement de cellules a été réalisé par cellule de Mallassez dans un volume précis d’un milieu liquide (tableau 9). Les résultats d’évaluation de la biomasse produits illustrés dans le tableau 4 montrent une augmentation proportionnelle avec le temps pour le milieu alternative en revanche dans le milieu landy montrent une augmentation dans les 48h et diminution après le troisième jour.

Tableau 9 Evaluation du nombre de cellules contenant dans le milieu de fermentation

Milieux Heures	Landy (cellule/ mL)	Alternative (cellule /mL)
24	$1,27 \times 10^7$	$1,07 \times 10^7$
48	$2,2 \times 10^7$	$2,14 \times 10^7$
72	$1,61 \times 10^7$	$8,4 \times 10^7$

pendant 72 heures.

4.9.3- Mesure de la biomasse

La production de biomasse est illustrée dans la figure 33, sur les deux milieux testés à savoir : (milieu landy et alternatif). Les premiers essais en fioles avec le milieu alternatif à base d'Azolla ont montré une nette amélioration de la production en biomasse de *Bacillus sp.* par appor au milieu de référence, et qui est le milieu landy (figure 33).

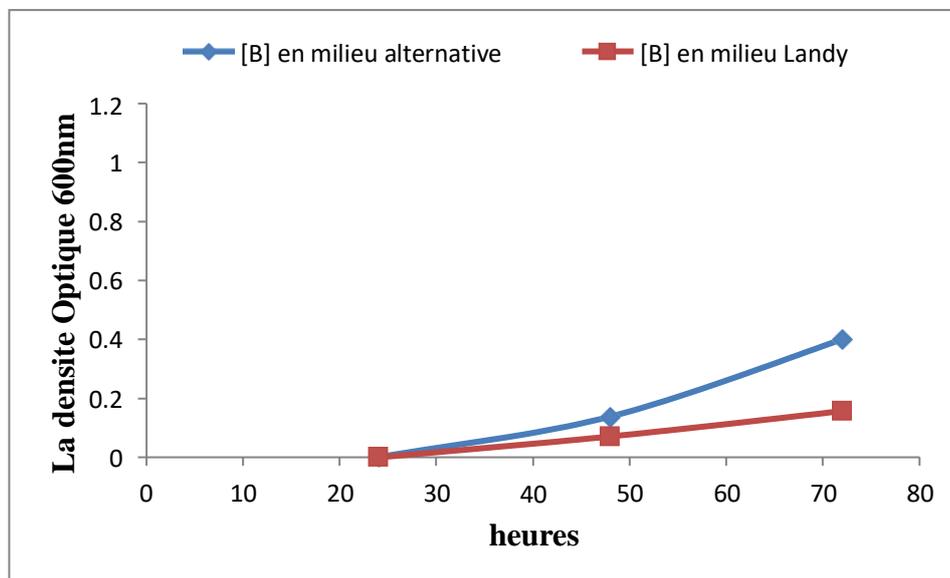


Figure 33 Production de biomasse par *Bacillus sp.* dans deux milieux : alternative et milieu landy

4.9.4- Détermination de la matière sèche cellulaire

Les résultats présentés dans le tableau ci-dessous montrant que la biomasse de la matière sèche cellulaire a augmenté au cours du temps dans le milieu alternatif. Cependant, on constate qu'il y a une augmentation lente pendant les deux premiers jours et puis il y a une chute de croissance le troisième jour (milieu landy).

Tableau 10 la matière sèche cellulaire pour milieu alternatif et milieu landy pendant 72 h.

Jours	MS (landy) (g)	MS (alternatif) (g)
1	0,115	0,104
2	0,148	0,183
3	0,079	0,270

4.9.5-Analyse des métabolites

Les résultats de la production de métabolites dans les deux milieux milieu (landy et alternatif) sont présentés dans la figure 34. En effet, l'allure de graphe montre qu'il y a une augmentation proportionnelle de la production au cours du temps dans le milieu alternatif par rapport à celle produite dans le milieu landy.

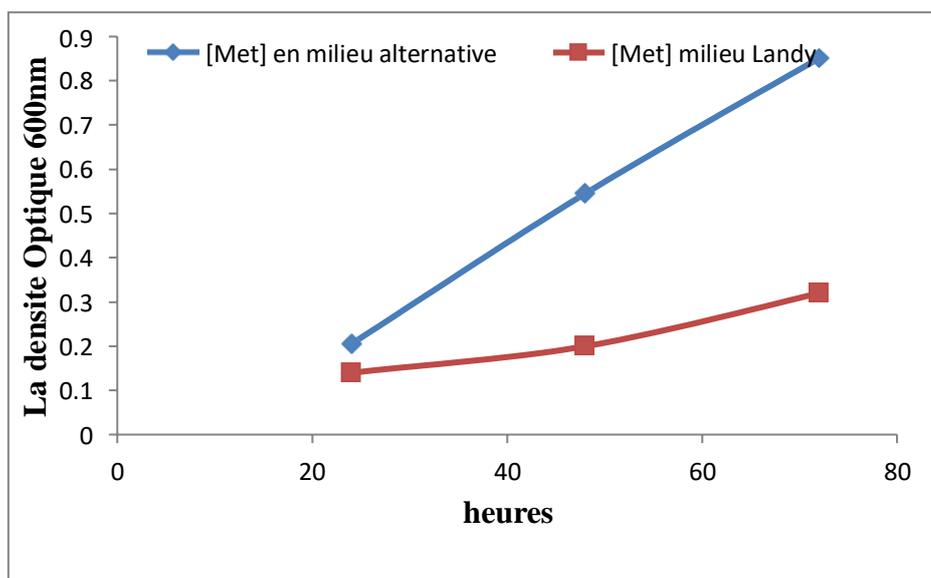


Figure 34 la production de métabolites par la souche bactérienne *Bacillus sp.* dans deux milieux à savoir : milieu landy et milieu alternatif à base d'azolla.

Ces résultats montrent que la quantité de biomasse produite et des métabolites en milieu alternatif à base d'Azolla sont d'autant plus grande que la quantité produite en milieu landy.

4.10- Lyophilisation

Après le troisième jour de fermentation, la biomasse obtenue est lyophilisée et transformée en poudre par lyophilisateur (LABCONCO, Annexe 3).

Discussion

5- Discussion

Au cours des dernières décennies, les impacts négatifs des engrais chimiques sur l'environnement ont entraîné la recherche de nouvelles façons d'augmenter la productivité dans le secteur agricole tout en diminuant l'éradication des ressources naturelles. Une autre méthode pour lutter contre les agents phytopathogènes consiste à utiliser un type de microorganismes bénéfique déjà présents dans le sol et la rhizosphère des plantes. On peut l'utiliser au lieu d'utiliser des produits chimiques néfastes pour favoriser la croissance des plantes. (Saraylou *et al.*, 2021). Les rhizobactéries favorisant la croissance des plantes (PGPR) ont divers modes d'action tels que la modification des hormones végétales, la sécrétion de composés organiques, l'augmentation de la tolérance au stress abiotique chez les plantes et l'amélioration de la disponibilité et de l'absorption des nutriments (Wang *et al.*, 2020).

Ce travail s'inscrit dans le cadre de la favorisation de croissance des plantes à partir de *Bacillus* isolé à partir du sol de la zone de la rhizosphère d'épinard. Cette notion d'étude comprend deux volets qui constituent les principaux objectifs: isolement et identification de bactérie antagoniste vis-à-vis des agents phytopathogènes de l'épinard et la production de biomasse et des métabolites sur milieu alternatif à base d'*Azolla*. Ce mémoire s'est attaché à évaluer et à comprendre, dans un premier objectif, l'effet de la souche sélectionnée sur le développement de souches phytopathogènes *in vitro* et *in situ*. Le deuxième objectif visait à rechercher un milieu alternatif, et qui est milieu à base d'*Azolla* afin de réduire les difficultés de production, à cause de leur disponibilité et en faible coût.

Les souches phytopathogènes : *Alternaria sp.*, *Cladosporium sp.*, *Pytium sp.*, ont été isolées et sélectionnées à partir de différents échantillons (feuilles, tiges et racines), présentant des symptômes de maladies fongiques des plantules de l'épinard cultivées dans la région de Dababya située à Hamma Bouzienne de Constantine. Dans un premier temps, la caractérisation macroscopique d'isolat fongique Alt2 montre un mycélium aérien cotonneux gris olive bien développé, les cultures présentent des sections blanches dans les bords et des sections gris foncé riches en conidies. En effet, L'observation microscopique de l'isolat Alt2 a révélé la présence des conidies pluricellulaires en chaînes, de forme cylindrique, droite ou sinueuse, genouillés, cloisonnées. De plus, les conidies sont piriformes à ovoïde, chaque conidie est formée de 3 à 5 cloisons transversales de couleur brune (Nounsi *et al.*, 2013). Selon les caractères macroscopiques et microscopiques de l'isolat fongique Alt2, la moisissure a été identifié, en présomptive, comme *Alternaria sp.* (Simmons, 2007).

La deuxième moisissure Alt1 a montré une texture poudreuse veloutée allant du vert olive au noir. Alors que l'observation microscopique montre un hyphes septé avec une pigmentation foncé de longueur varier, les conidiospores sont de grand taille uni ou pluricellulaire de forme cylindrique, ovoïde, ovale (Talhi *et al.*, 2021). Les caractères macroscopique et microscopique sont en accord avec ceux de (Al Musawi *et al.*, 2022) qui ont rapporté que les colonies cultivées sur milieu PDA étaient de couleur olivâtre foncé à noir verdâtre et veloutées. Les conidiospores fongiques étaient étroitement cloisonnés avec des septa épais et sombres ainsi que ramifiés. Selon les caractères précédents l'isolat Alt1 a été identifié comme *Cladosporium sp.* (Avasthi *et al.*, 2016). Pour la troisième moisissure F a montré des caractères macroscopiques à savoir: la couleur de la colonie est blanche d'aspect cotonneuse, et des reliefs surélevés avec une croissance mycélienne irrégulières (Arthur W *et al.*, 1986).

Le test de pathogénicité est déroulé avec réussite. La pulvérisation des plantules de la tomate avec les trois souches fongique isolées *Alternaria sp.*, *Cladosporium sp.*, *Pythium sp.*, dans chaque pots a provoqué des symptômes au niveau des feuille après vingt jours de test. Le taux de sévérité de la maladie pour chaque test a marqué la valeur de 76 %. Les symptômes sont représentés par l'apparition des taches sur les feuilles de couleur jaune avec des nécroses brunes diffuse avec un halo jaune, et aussi au niveau des bordures de la feuille. Ces observations sont plus ou moins cohérentes avec (Donnell, 1980; Stammler *et al.*, 2013).

Pour lutter contre les agents phytopathogènes, certains agents antagonistes étudiés ont la capacité d'inhiber les agents phytopathogènes. En effet, dans le présent travail l'isolement a été effectué à partir du sol de la rhizosphère d'épinard au niveau de la région de Hamma Bouziane à cause de l'importance et la richesse de cette région. Selon Dib *et al.* (2009) le sol de la rhizosphère a une source écologiques importante pour l'isolement des microorganismes résistants qui subit des caractéristiques phénotypiques et génotypiques particuliers, grâce aux exsudats racinaires et aux interactions diverses tels que : (microorganismes-microorganismes) et (microorganismes- plantes), la symbiose, le parasitisme et l'antagonisme etc. Donc la chance de tomber sur des populations microbiennes à des potentialités de bio-contrôle augmente.

Le test antagoniste effectué dans le présent travail, sur PDA, a permis de sélectionner un isolat bactérien B1 développant une activité antifongique vis-à-vis de certains moisissures phytopathogènes en l'occurrence : *Alternaria sp.*, *Pythium sp.* et *Cladosporium sp.* Plusieurs études ont décrit les effets antifongiques, *in vitro*, des souches de *Bacillus* vis-à-vis de moisissures pathogènes (Ongena *et al.*, 2007; Ait kaki, 2013; Milet, 2017).

Le taux d'inhibition de la croissance fongique par l'isolat (B1) a permis de constater que sa valeur varie entre 50 et 58%, l'isolat B1 a donné un meilleur effet avec *Alternaria sp.* (Alt2)

avec un pourcentage de 58,33%. D'après les résultats de Milet. (2017), la différence entre ces résultats peut exprimer par rapport aux conditions environnementales, la région d'isolement et aussi la différence de climat, tous ces conditions donnent une explication aux résultats enregistrés, le taux d'inhibition de *Bacillus* a révélé un effet sur *Pythium* (F1) avec un pourcentage de 50%, qui est moins efficace par rapport aux résultats obtenus dans le premier cas, cependant, les résultats de Duy et al. (2014) montrent un taux plus élevé de *Trichoderma harzianum* et *Trichoderma saturnisporum* avec *Pythium sp.*

La caractérisation des bactéries du genre *Bacillus*, pour leur capacité de promotion et de protection des plantes, *in vitro* et *in situ*, a été réalisée sur des souches isolées de la rhizosphère (Beneduzi *et al.*, 2008). L'étude morphologique de l'agent antagonisme de l'isolat B1 qui a un effet sur les agents phytopathogènes, montre les caractères suivants, en l'occurrence : des colonies de tailles moyenne; forme irrégulier; de couleur crémeuse et aussi a une texture muqueuse. Comparant avec Yousef Ali, (2014) on trouve que les caractères macroscopiques pour les deux sont presque identiques. L'observation microscopique à l'état frais a révélé que la bactérie est mobile et ont une forme de petit cocci, même les résultats trouver par (Yousef Ali, 2014; Milet, 2017). La coloration de Gram de l'isolat a montré que la bactérie a des bacilles à Gram positif (G+). Les tests d'identification préliminaires, morphologique et physiologique d'isolat sélectionné, a confirmé que tous la bactérie appartient au genre *Bacillus*.

L'activité protéolytique de la souche de *Bacillus* est révélée par la détection de zone d'hydrolyse sur le milieu de protéase et donc le test est positif, comme la souche *Bacillus mojavenensis* et *Bacillus subtilis* qui a été étudié par (Ait kaki *et al.*, 2013), alors les résultats de ce test est aussi positif, ce test positif est confirmé aussi par (Ayantnij *et al.*, 2020; Nanuny *et al.*, 2021). Parmi les tests utilisés aussi est le chitinase, après l'incubation de la lecture, une zone de lyse sur la boîte de Petri a été apparue au tour du disque de la bactérie testé. Donc cette souche possède une activité enzymatique de chitinase prouvé aussi par (Ayantola, 2020). Parmi aussi les tests enzymatiques utilisés, c'est l'amylase et dans notre étude le résultat de ce test sur la souche de *Bacillus* est positif, par une zone de lyse ou un halo qui prouve que le résultat est positif (une dégradation), d'après les résultats de (Marwan *et al.*, 2020), puis le dernier test concernant les tests enzymatiques; c'est l'activité lipasique. En effet, selon Saba shamin et al. (2020) le résultat de l'activité lipasique est positif et aussi nos résultats de lipase ont été aussi positifs.

Plusieurs espèces de *Bacillus* sont utilisées pour protéger les plantes contre les moisissures phytopathogènes. Il s'agit de *B. amyloliquefaciens*, *B. mojavenensis*, *B. subtilis*, *B. licheniformis* (Milet, 2017 ; Ait KAKI, 2013). Dans le présent travail, *Bacillus sp.* est testée *in situ* sur une

variété de tomate (*Blacmine*). Cette plante maraichère a été choisie car sa production en Algérie connaît un manque accru. La souche bactérienne *Bacillus sp.* testée, ici, a une influence positive sur la promotion et la protection des plantes de tomate, dans des conditions de pots. En effet, la souche appliquée avec les agents phytopathogène isolés dans ce travail assure un meilleur effet sur l'augmentation la taille des plantes et la diminution de la gravité des maladies causées par *Alternaria sp.*, *Cladosporium sp.*, *Pythium sp.* Ces paramètres versus le témoin, estimés après un moi de repiquage de plantules de tomate, étaient (27, 28, 29 cm vs 24 cm). C'est résultat sont en accord avec les résultats obtenus dans les travaux de Milet. (2017), et qui a testé l'effet de différentes souches de *Bacillus* (*B. amyloliquefaciens*, *B. mojavensis*) sur des plantules de tomate contre l'agent de l'Alternariose, et qui est *Alternaria alternata* et Ait KAKI. (2013) qui a testé les *Bacillus* sur des plantes de pois chiche contre les agents phytopathogènes *Sclerotonia sclerotium* et *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceri*.

Dans le travail qui suit, la production de biomasse et des métabolites est effectuée en fiole d'Erlenmeyer. De nombreuses expériences sont rapportées dans la littérature sur l'effet de la composition de milieu de culture sur la production de la biomasse, et notamment sur la production de métabolites (Akpa, 2001). Dans notre travail, l'intérêt a été porté sur milieu de Landy, qui est le milieu de référence pour la production de la biomasse de *Bacillus* et de métabolites et le comparé avec un milieu alternatif à base d'*Azolla* disponibles et moins cher, utiliser pour la première fois pour sa richesse en protéine (19-30%) (Hasan *et al.*, 2009), et en matière minérale (10-20%) qui peuvent être utilisées comme source de macro et micro minéraux, d'autres éléments jouent un rôle dans le métabolisme bactérien (sodium, potassium) et dans les réactions enzymatiques (calcium, fer, manganèse, cuivre) (Feedipedia, 2015). Des cultures en milieu à base d'*Azolla* solide avec un indicateur de pH ont aussi été entreprises afin de les comparer à celles réalisées en milieu GN. Les cultures effectuées dans les boîtes de Petri prouvent que le milieu choisi permet d'obtenir une croissance microbienne satisfaisante.

Les résultats de fermentation en fiole d'Erlenmeyer ont montré une bonne production de biomasse et de métabolites où le comptage du nombre de cellule produit a atteint la valeur maximal de $8,4 \cdot 10^7$ cellule /mL dans le milieu alternative par apport au milieu landy, qui a montré des valeurs inférieure de production. Après 72h on observe une diminution de la production, qui est du a l'épuisement de l'élément nutritif dans le milieu utilisé par la bactérie. Les tests effectués dans les fioles d'Erlenmeyer confirment que le milieu alternatif

utilisé permet d'obtenir une croissance satisfaisante de biomasse et une production de métabolites plus grande.

La méthode classique de lutte chimique contre les mauvaises herbes, jadis considérée comme panacée, fait de plus en plus place à la lutte biologique par utilisation de micro-organismes (Kouassi, 2001), et plusieurs chercheurs sont d'accord avec lui, ils utilisent des microorganismes pour l'utiliser comme des biopesticides (Ouakid *et al.*, 2008 ; Pandin *et al.*, 2019) (Frederiks) (Pandin *et al.*, 2019). Dans ce travail la production de la biomasse de la bactérie à l'échelle de laboratoire, a permis de constater l'importance économique de la souche. En effet, la biomasse produite durant la période de la fermentation a été lyophilisée (Bodzen, 2021).

*Conclusion et
perspectives*

6- Conclusion et perspectives

Dans l'agriculture, il est nécessaire de rechercher des moyens respectueux de l'environnement pour augmenter la production de rendement sans endommager le sol et l'eau. Des dommages peuvent résulter de l'application de différents engrais chimiques. L'utilisation de bio-pesticides biologiques comme alternative aux pesticides chimiques devrait être étudiée plus avant dans l'agriculture. *Bacillus*, avec toutes les preuves à l'appui de ses caractéristiques bénéfiques, peut être considéré comme un bio-pesticides biologiques. Jusqu'à présent, il a été rarement appliqué comme inoculant pour augmenter le rendement des produits agricoles, malgré l'excellent potentiel montré dans un grand nombre de publications scientifiques. Nous avons trouvé une souche de *Bacillus sp.* bénéfique isolée à partir du sol de la zone de la rhizosphère de l'épinard, avec la capacité d'améliorer le rendement dans des conditions *in situ* et aussi avec la capacité de production des enzymes intéressants dégradant la paroi fongique (chitinase, lipase, protéase et amylase). Cette espèce est maintenue pour de futures recherches potentielles sur d'autres types de plantes dans le terrain. La promotion de la croissance des plantes de tomate suggèrent que cette souche pourrait être appliquée à la promotion de la croissance des plantes de tomate. D'autres expériences sont nécessaires pour vérifier davantage les effets sur d'autres plantes dans des conditions de croissance naturelles, ce qui est l'objectif de la prochaine étude.

Concernant les agents phytopathogènes, l'exploration des échantillons de l'épinard (feuilles, tiges et racines), cultivé dans la région de Hamma Bouziane (Constantine), présentant des différents symptômes de maladies fongiques a permis de sélectionner trois moisissure phytopathogènes qu'ils s'agissent d'*Alternaria sp.*, *Cladosporium sp.* et *Pythium sp.* Le test de pathogénicité a montré que ces souches fongiques causent des symptômes sur les plantules de tomate avec un degré de sévérité égale ou supérieur à 76% pour les trois agents phytopathogènes.

Le test antagoniste a permis d'obtenir un taux d'inhibition varient entre 48% et 58% sur *Alternaria sp.*, *Cladosporium sp.* et *Pythium sp.* Cependant la souche *Bacillus sp.* a développé un meilleur effet d'inhibition vis-à-vis *Alternaria sp.*

Les expériences réalisées dans le milieu alternatif à base d'*Azolla* sur la souche de *Bacillus sp.* permet de conclure que la production totale en biomasse et en métabolite est élevée. Cependant, l'utilisation de milieu Landy aurait globalement une influence négative sur la production des métabolites.

Au terme de cette ébauche, de nombreuses perspectives découlent. En effet, des études plus approfondies sur les interactions bactérie antagoniste et moisissures phytopathogènes, plante et bactérie antagoniste sélectionnée; Identification moléculaire de microorganismes sélectionnés ; Identification moléculaire des métabolites produits par la souche sélectionnée ; La préparation de bio-fertilisant et de bio-contrôle par la production de la biomasse de *Bacillus sp.*; Une attention particulière sera réservée à la plante d'Azolla dans les domaines de la biotechnologie « Optimisation de milieu de fermentation»;

Plusieurs expériences complémentaires *in situ* doivent être réalisées, en l'occurrence, élargir le spectre des plantes hôtes et des pathogènes ; déterminer la dose minimale effectrice du produit et de suivre sa viabilité à longs termes lors du stockage et au niveau du sol inoculé ; tester les souches bactériennes dans des phénomènes inductibles autres que ceux liés aux maladies biotiques, comme la résistance à des stress hydriques, salins ou des blessures et leurs interactions avec les autres techniques culturales de l'agriculture intégrée.

Abstract

7- Abstract

The exploration of soil samples from the rhizosphere zone of spinach plants from the region of Ain Ben Sbaa, Hamma Bouziane (Constantine), resulted in twelve bacterial isolates. A bacterium belonging to the genus *Bacillus* was selected, *in vitro*, by the direct contact technique against the phytopathogenic agents of spinach. The exploitation of samples presenting symptoms of fungal diseases of spinach from the region of Dababya, Hamma Bouziane (Constantine) allowed obtaining three fungal isolates. Morphological identification of these isolates revealed that they are *Cladosporium sp.*, *Alternaria sp.* and *Pythium sp.* The phytopathogenicity test of *Cladosporium sp.*, *Alternaria sp.* and *Pythium sp.* on tomato seedlings resulted in a severity level of 76%. The selected antagonist agent B1 showed an inhibition rate varying between 48% and 58%. However, B1 developed a better inhibition effect against *Alternaria sp.* Morphological identification and biochemical tests of the selected bacterial isolate showed that the strain is *Bacillus sp.* The *in vivo* test was performed in pot condition on tomato seedlings and revealed an interesting capacity of the selected *Bacillus sp.* strain for stimulation and biocontrol. The selected *Bacillus sp.* strain is able to secrete fungal wall degradation enzymes, including proteases, chitinases, lipases and amylases. In fact, it should be emphasized that the present work is the first to have the possibility of producing the biomass of *Bacillus sp.* and the metabolites on an alternative medium rich in raw material, available and in low cost, and which is based on *Azolla*. A comparative study on its development and its capacity to produce biomass and metabolites under different culture conditions, namely; landy medium and alternative medium based on *Azolla*. Indeed, *Bacillus sp.* is able to develop in both media, however, its development is much more important on the alternative medium (8.4×10^7 cells/mL), compared to the landy medium the values are lower.

Keywords: Spinach, *Bacillus*, *Cladosporium*, *Alternaria*, antagonist test, *in vivo* test, fermentation.

ملخص

8- ملخص

أدى استكشاف عينات التربة من منطقة الريسوسفير لنباتات السبانخ من منطقة عين بن السبع، حامة بوزيان (قسنطينة)، إلى ، في المختبر، من خلال تقنية الاتصال المباشر ضد *Bacillus* تم اختيار بكتيريا تنتمي إلى جنس . عزل اثني عشر بكتيريا سمح استغلال العينات التي تظهر أعراض الأمراض الفطرية للسبانخ من منطقة . العوامل الممرضة النباتية للسبانخ :كشف التحديد المورفولوجي لهذه العزلات أنها . الضبابية، حامة بوزيان (قسنطينة) بالحصول على ثلاث عزلات فطرية *Pythium sp.* و *Cladosporium sp.* و *Alternaria sp.*

أدى اختبار الأمراض النباتية لـ *Pythium sp.* و *Cladosporium sp.* و *Alternaria sp.* على شتلات الطماطم إلى مستوى شدة 76%. أظهرت البكتيريا المختارة B1 معدل تثبيط يتراوح بين 48% و 58%. ومع ذلك، طور B1 تأثير تثبيط أفضل ضد *Alternaria sp.* أظهرت الاختبارات المورفولوجية والكيميائية الحيوية للعزلة البكتيرية المختارة أن السلالة هي *Bacillus sp.* تم إجراء الاختبار في *in vivo* في حالة وعاء على شتلات الطماطم وكشف عن قدرة مثيرة للاهتمام لسلالة *Bacillus sp.* المختارة للتحفيز والمراقبة الحيوية. سلالة *Bacillus sp.* المختارة قادرة على إفراز إنزيمات تحلل الجدار الفطري، بما في ذلك البروتياز والكتيناز والليباز والأميلاز. وفي الواقع، ينبغي التأكيد على أن العمل الحالي هو أول عمل تتاح له إمكانية إنتاج الكتلة الأحيائية للعصوية والمستقلبات على وسط بديل غني بالمواد الخام، ومتاح بتكلفة منخفضة، ويستند إلى أرولا. دراسة مقارنة عن تطوره وقدرته على إنتاج الكتلة الأحيائية والمستقلبات في ظل ظروف زراعية مختلفة، وهي ؛ وسط غذائي بديل يعتمد على *Azolla* في الواقع، *Bacillus sp.* قادر على التطور في كلا الوسيلتين، ومع ذلك، فإن تطوره أكثر أهمية على الوسط البديل (8,4 × الخلايا /107/مل)، مقارنة بالوسط لاندني .

الكلمات الرئيسية: السبانخ، *Bacillus*، *Cladosporium*، *Alternaria*، تقنية الاتصال المباشر، اختبار الأمراض النباتية، التخمر .

*Références
bibliographiques*

9- References bibliographiques

- A. A. Abbasher., D. H.** (1998). Fungal pathogens for biological control of *Striga hermonthica* on sorghum and pearl millet in West Africa. *African Crop Science Journal* , 179-188.
- Ait kaki.A.** (2013). Recherche de nouvelles potentialités de bactéries du genre *Bacillus* pour l'agriculture et l'agroalimentaire. (Thèse Doctorat. Université constantine 1).
- Agbaje Lateef ., Isiaka Adedayo Adelere et Evariste Bosco Gueguim-Kana.** (2015) . The biology and potential biotechnological applications of *Bacillus safensis*.
- Ahmad., M. &Kibret.** (2013).Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: current perspective. *J King Saud Univer-Scien* 26(01): 1-20.
- Akpa., Philippe Jacques., Bernard Wathelet., Regine., Herbert.** (2001) . Influence des conditions de culture sur la production de lipopeptides par *Bacillus subtilis*
- Alabouvette C, Olivain C and Steinberg C** (2006).Biological control of plant diseases :theEuropean situation. *European Journal of Plant Pathology*.
- Alcaraz L.D., Moreno-Hagelsieb G., Eguiarte L.E., Souza V., Herrera-Estrella L. and Olmedo G.** (2010) Understanding the evolutionary relationships and major traits of *Bacillus* through comparative genomics. *BMC Genomics*.
- Aman, M.** (1969).Medicinal secrets of your food. 2nd edn., indo-american hospital, mysore, india, pp.
- Anton Hartmann., Michael Rothballer et Michael Schmid.** (2008).« Lorenz Hiltner, a pioneer in rhizosphere microbial ecology and soil bacteriology research », *Plant and Soil*, vol. 312, no 1-2, novembre, p. 7
- Antoun H., and Prévost D.** (2005).Ecology of plant growth promoting rhizobacteria.Z. A.Siddiqui (ed.), *PGPR: Biocontrol and Biofertilization*. p 1–38.
- Anyszka et al., D. Z.** (2018). Méthodologie de production intégrée d'épinards. *journal officiel* 2018,TEXTE 1301 , 28 -29.
- Avasthi, S., Gautam., A. et Bhadauria, R.** (2016) . Premier signalement de *Cladosporium sphaerospermum* causant la maladie des taches foliaires de l'Aloe vera en Inde. *Journal of Crop Protection* , vol. 5, non. 4.
- Ayantunji Y.J., Richard K.O., Folake O., Kehinden.A.** (2020). optimisation of Alkaline protease production in submerged fermentation using *Bacillus cereus* isolated from an abattoir wastewater in Ile-IFE , Nigeria , P 4-8.

- Atlasbig.** Maps and Statistics of the world and regions, [en ligne]. page consultée le 28/05/2022. <https://www.atlasbig.com/fr-fr>.
- Barea JM., Azc´on R., Azc´on-Aguilar C.** (2005). Interactions between mycorrhizal fungi and bacteria to improve plant nutrient cycling and soil structure. In: Buscot F, Varma A, editors. *microorganisms in Soils: Roles in Genesis and Functions*. Berlin, Heidelberg: Springer-verlag; p 195–212.
- Beneduzi., A., Peres, D., da Costa, P. B., Zanettini., M. H. B., & Passaglia., L. M. P.** (2008). Genetic and phenotypic diversity of plant-growth-promoting bacilli isolated from wheat fields in southern Brazil. *Research in microbiology*, 159(4), 244-250.
- Benítez, T., Rincón, A. M., Limón, M. C., & Codón, A. C.** (2004). Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *International microbiology*, 7(4).
- Bessadat.** (2014). Isolement, identification et caractérisation des *Alternaria* sp.
- Bonmatin J.M., Laprévotte O and Peypoux F.** (2003). Diversity among microbial cyclic lipopeptides: iturins and surfactins. Activity-structure relationships to design new bioactive agents. *Comb. Chem. High Throughput Screen.* 6: 541-556.
- Boullard, B.** (2001). *Plantes médicinales du monde: croyances et réalités*. Ed. Estem, 636p.
- Botton B. Breton, A., Fevre ,M., Gauthier S., Guy P.H. Larpent J.P. Reymond P. Sanglier**
- Buckingham, Kent W., Ela, S. W., Morris, J. G. & Goldman, C. R.** (1978). Nutritive value of nitrogen fixing aquatic fern *Azolla filiculoides*. *J. Agr&. Food Chem.*, 28, 1230-34.
- Cameotra., S.S. et Makkar, R.S.** (2004). Recent applications of biosurfactants as biological and immunological molecules. *Curr Opin Microbiol*; 7:262–6.
- Castillo, L. S., Gerpacio, A. L., Pascual, E S. D., Mercado, C. I., Abenir, E. E. & Palo, L. P.** (1982). *Azolla* in broiler diets. *Livestock and Poultry Circular and Research News*, 10(3), 1-2.
- Chabasse, D.** (2002). Les moisissures d'intérêt médical. Cahier N°25 de formation de biologie médicale, pp. 25-27.
- Champion R, Ray NaIG.** (2009). La carie commune du blé : une revenante. *phytona. la défense des végétaux* .N450.P.12-20
- Chithan K.** (2019). Isolation optimization and characterization of cellulose enzyme production by *Bacillus subtilis* . P 108-110.
- Chopra, R. N., Nayar, S. L., Chopra, I. C.** (1956). *Glossary of indian medicinal plants*. Council of scientific and industrial research, New Delhi, p.232
- Couplan, F.** (2009). *Le régal végétal, plantes sauvages comestibles*. Ed. Ellebore, 527p
- Delarras C.** (2007). *Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyse ou de contrôle sanitaire*. Edition TEC et DOC, Lavoisier, Paris.

- Deven, M., Sateesh, B.** (2014). Pharmacological activity of spinaciaoleracealinn.-a complete overview. Asian journal of pharmaceutical research and development ISSN 2320-4850 Vol. 2 (1) Jan. -Feb. 2014.
- Devine, K.M.,** (1995). The Bacillus subtilis genome project: aims and progress. Tibtech, 13: 210-216.
- Dib, J.R., Weiss, A., Neumann, A., Ordoñez, O., Estévez, M.C., Farías, M.E.** (2009). Isolation of bacteria from remote high altitude Andean lake able to grow in the presence of antibiotics. Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery. 4: 66–76.
- Diogon, T.** (2002). Isolement et caractérisation de messagers codants pour des peroxydases chez SpinaciaoleraceaL. Thèse de doctorat en sciences. Université de Genève, Suisse. 150p.
- Djellout H., Mekheldi D., Belkacem KK., Raio A et Krimi Z.** (2019). Evaluation de potentiel de souche antagoniste de Bacillus spp. et de pseudomonasspp. Dans le contrôle d'agrobacterium spp. Pathogène impliqué dans la maladie de galle de collet. Revue Agrobiologia. ; 9(1): 1267-1283.
- Duy Phu Le ., Smith.M , Hudler.G.W ., Aitken.E.** (2014) , Pythium soft rot of ginger : detection and identification of the causal pathogens , and their control , p 161-162.
- Earl., AM., Losick., R. et Kolter., R.** (2008). Écologie et génomique de Bacillus subtilis. Tendances en microbiologie , 16 (6), 269-275.
- Elizabeth., E., & J. H.** (1998). Biocontrol of plant disease: a (Gram-) positive perspectiv. USA: ELSEVIER.
- Emily claudia ricci. (2015).** Investigating the role of pseudomonas sp. And bacillus sp biofilms as plant growth promoting inoculants. McGilluniversity, motereal. Quebec. Canada. enhancing crop productivity. Trends in Biotechnology, 7: 39-43. Environ. 15(2): 327-337.
- FAO.** (2006). STAT data. <http://faostat.fao.org/>.
- Fujita, N., Ayukawa, Y., Fuke, M., Teraoka, T., Watanabe, K., Arie, T., Komatsu, K.** (2017). Rapid sex identification method of spinach (Spinaciaoleracea L.) in the vegetative stage using loop-mediated isothermal amplification. Planta. 245(1), 221-226
- J.J., Vayssier Y , Veau P .** (1990). Moissisures utiles et nuisible impportance industrielle. 2éme édition . maosson collection biotechnologies . p.34-42.
- Gaikwad, P. S., Shete, R. V., & Otari, K. V.** (2010). Spinaciaoleracea Linn: A pharmacognostic and pharmacological overview. International Journal of Research in Ayurveda and Pharmacy (IJRAP), 1(1), 78-84.

- Gil, M.I., Ferreres, F., Tomas-Barberan, F.A.**(1999). Effect of postharvest storage and processing on the antioxidant constituents (flavonoids and vitamin C) of fresh-cut spinach. *J. Agric. Food Chem* 47: 2213-2217.
- Giri B., Giang PH., Kumari R., Prasad R.** (2005). Microbial diversity in soils. In: Buscot F, varma A, editors. *Microorganisms in Soils: Roles in Genesis and Functions*. Heidelberg, germany: Springer-Verlag;. p 195–212.
- Gordon, R. E., Haynes, W. C., et Pang, C. H.-N.** (1973). The Genus *Bacillus*. Dans: *Practical Handbook of Microbiology* (Gordon, E. et Green L. H.). CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL, États-Unis. Pp 309-337.
- Greathead, D. J., Kooyman, C., Launois-Luong, M. H., et Popov, G. B.** (1994). Les ennemis naturels des 8°criquets du Sahel. Collection acridologie opérationnelle N CILSS/DFPV, Niamey, Bp 12625. Niger.
- Gupta, R., Beg, Q.K., Lorenz, P.** (2002). Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 59, 15–32.
- Hamdache A ., Azaker R., Lamarti A ., Aleu J. and Collado, LG.** (2013) Comparative genome analysis of *Bacillus* spp. and its relationship with bioactive nonribosomal peptide production. *Phytochem Rev* 12: 685-716 .
- Hanemian M.,** (2012). Rôle de la protéine CLV1 dans la sensibilité d'*Arabidopsis thaliana* à la bactérie phytopathogène *Ralstonia solanacearum*. Thèse de Doctorat en Interactions Plantes-Microorganismes. L'Université Toulouse III - Paul Sabatier. p 190.
- Henni, J. E.** (1998). Morphologie, pouvoir pathogène et diversité génétique chez *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Doctoral dissertation, Thèse de Doctorat d'état. Université d'Oran)
- Haas, D., Défago, G.** (2005). Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nat. Rev. Microb.* 1129.
- Hibar, M. D.R.** (2005). Effet inhibiteur in vitro et in vivo de *Trichoderma harzianum* sur *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicislycopersici*. Tunisie: Laboratoire de Phytopathologie. École supérieure d'Horticulture de Chott-Mariem. 4042 Sousse.
- Horak ., G. Engelbrecht., P.J. Jansen van Rensburg and S. Claassens.** (2019) Microbial metabolomics: essential definitions and the importance of cultivation conditions for utilizing *Bacillus* species as bio-nematicides. *Journal of Applied Microbiology* 127, 326--343 ©2019 The Society for Applied Microbiology.
- Hoorman J. J., Islam R.** (2010). Understanding soil microbes and nutrient recycling. FACT SHEET.

- ISO.** (2017). Microbiologie de la chaîne alimentaire -- Préparation des échantillons pour essai, de la suspension initiale et des dilutions décimales pour examen microbiologique.
- Itsouhou et al., E. N.** (2020). Exploiter les activités biologiques dans les souches sol-bacille pour promouvoir la découverte de nouveaux composés bioactifs. *Journal de microbiologie appliquée et environnementale* .
- Jacques, P. D.** (1993). Les mécanismes biochimiques développés par les "Pseudomonas" fluorescents dans la lutte biologique contre les maladies des plantes transmises par le sol. *Cahiers Agricultures* 2(5) , 301-307.
- Jijakly M.H.** (2003). La lutte biologique en phytopathologie, In : *Phytopathology*. Lepoivre P. (Eds). De Boeck, Bruxelles .
- Jourdheuil P., P. Grison ., A. Fraval.** (1991). La lutte biologique: un aperçu historique. *Le Courrier de la Cellule Environnement de l'INRA*, n°15.
- K.J.Ayantola , E.D.Fagbohun ,** 2020 , enzymatic activity of rhizobacillus isolated from tomato rhizosphere , p 13-16.
- Karbalaei-Heidari., H.R., Amoozegar, M.A., Ziaee A.A.** (2009). Production, optimization and purification of a novel extracellular protease from the moderately halophilic bacterium. *Ind Microbiol Biotechnol* 36, 21-27.
- Khan, M. S., Zaidi, A., Wani, P. A., & Oves, M.** (2009). Role of plant growth promoting rhizobacteria in the remediation of metal contaminated soils. *Environmental chemistry letters*, 7(1), 1-19.
- Kothari, V.V., Kothari, R.K., Kothari, C.R., Bhatt, V.D., Nathani, N.M., Koringa, P.G., Joshi, C.G. & Vyas, B.R.M.**(2013). Genomic sequence of salt-tolerant *Bacillus safensis* strain VK, isolated from saline desert area of Gujarat, India. *Genome A* 1: e00671-13.
- Kobayashi DY, Crouch JA.**(2009). Bacterial/fungal interactions: from pathogens to mutualistic endosymbionts. *Annu Rev Phytopathol*;47:63–82.
- Kloepper, JW., Lifshitz, R., & Zablotowicz, RM.** (1989). Inoculum bactérien libre pour améliorer la productivité des cultures. *Tendances de la biotechnologie* , 7 (2), 39-44.
- Kumar, NR., Arasu, VT et Gunasekaran, P.** (2002). Génotypage de composés antifongiques produisant des rhizobactéries favorisant la croissance des plantes, *Pseudomonas fluorescens*. *Sciences actuelles* , 1463-1466.
- Kunst, F., Ogasawara, N., Moszer, I., Albertini, A. M., Alloni, G. O., Azevedo, V., ... & Yoshikawa, H.** (1997). The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature*, 390(6657), 249-256.

Qureshi M. A., Ahmad Z. A., Akhtar. N., Iqbal A., Mujeeb F. and Shakir M. A. (2012) Role of phosphate solubilizing bacteria (psb) in enhancing P availability and promoting cotton growth. *The Journal of Animal & Plant Sciences*, 22(1): 204-210.

Lacoste, S. (2014). Ma bible de la phytothérapie : Le guide de référence pour se soigner avec les plantes. Leduc.s Éditions, 648 p

Larsen, E., Christensen, L.P.(2007). Common vegetables and fruits as a source of 1,2-di-o- α -linolenoyl-3-o- β -d-galactopyranosyl-sn-glycerol, a potential anti-inflammatory and antitumor agent. *Journal of foodlipids* ; 14, 272-279.

Latha P., Anand T., Ragupathi N., Prakasam V., Samiyappan R. (2009). Antimicrobial activity of plant extracts and induction of systemic resistance in tomato plants by mixtures of PGPR strains and Zimmu leaf extract against *Alternaria solani*. *Biological Control*, 50: 85–93.

Lemanceau, L. (1992). Effets bénéfiques de rhizobactéries sur les plantes : exemple des *Pseudomonas* spp fluorescents 413–437, 414.

Lepinay, C. (2013). Etude des interactions plantes-microbes et microbes-microbes au sein de la rhizosphère, sous un aspect coûts-bénéfices, dans un contexte de variation environnementale (Doctoral dissertation, Université de Bourgogne).

Lepoivre P. (2003). *Phytopathologie*. De Boeck les presses agronomiques de Gembloux, p 432.

Lombi.E. (2001). Trace Elements in the Rhizosphere. CRC Press. Cité dans *Microbial Health of the Rhizosphere*.

Lomnitski, L., Carbonatto, M., Ben-Shaul, V., Peano, S., Conz, A., Corradin, L., Maronpot, R.R., Grossman, S., Nyska, A. (2000). The prophylactic effects of natural water-soluble antioxidant from spinach and apocynin in a rat model of lipopolysaccharide- induced endotoxemia. *Toxicolpathol* ;28: 588-600.

Lyatim, S. (2008). Moisissures d'intérêt médical Etude récente prospective au laboratoire de parasitologie et mycologie à l'hôpital d'enfants de rabat:(A propos de 133 prélèvements (Doctoral dissertation).

Ma, L., & Lin, XM (2010). Effets de la lutéine et de la zéaxanthine sur certains aspects de la santé oculaire. *Journal des sciences de l'alimentation et de l'agriculture* , 90 (1), 2-12.

Maeda, N., Hada, T. (2005). Effects of DNA polymerase inhibitory and antitumor activities of lipase-hydrolyzed glycolipid fractions from spinach. *J.Nutr. Biochem*. February, 16(2):121-8.

M. C. N. Jayasuriya, a. R. (1988). Fermentation of Straw-based Diets Containing *Azolla* (*Azolla caroliniana* Willd) using the Rumen Simulation Technique (Rusitec). Vienna.

Makkar , RS., Cameotra, SS et Banat, IM. (2011). Progrès dans l'utilisation de substrats renouvelables pour la production de biosurfactants. *AMB express* , 1 (1), 1-19.

Marie Koua et al, J. B. (2018). Caractérisation phénotypique de 52 souches des *Bacillus* isolées à partir de racines fraîches de manioc cultivées en Côte d'Ivoire .

Marwan J.M, Tzyanti .I ., Aidil .A.H ., Wan Syaidatul.A . (2020), optimization and production of alpha amylase from thermophilic *Bacillus* spp. and its application in food waste bio- degradable , p 3-5.

Milet . A . (2017). Isolement de microorganismes à partir du sol des régions arides et sélection d'isolats à effet antagoniste sur l'agent de l'Alternariose. (Thèse Doctorat. Université Constantine 1).

Morgan J. A. W., Bending G. D. and White P. J.(2005). Biological costs and benefits to plant–microbe interactions in the rhizosphere.*Journal of Experimental Botany.*56 : 1729-

Munro, D. B.,Small, E. (1998). Les légumes du canada. Ed. Nrc Research Press. 436 p.

Nexles. produits et conseils pour la lutte anti nuisibles et la protection des plantes,[en ligne]. page consultée le 17/03/2022. <https://www.nexles.com/fr/> .

Nihorimbere, V., Ongena, M., Smargiassi, M., & Thonart, P. (2011). Beneficial effect of the rhizosphere microbial community for plant growth and health. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, 15(2).

Norini M .P. (2007). Ecodynamique des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) et des communautés microbiennes dans des sols dans des sols à pollution mixte (HAP), métaux, avant et après traitement par biopile et par désorption thermique : influence de la rhizosphère et de mycorhization .thèse de Doctorat en Géosciences .Université Henri Poincaré Nancy. p33.

p.1164.*Phytopathology*, 14: 121-144.

Ongena M., Jourdan E., Adam A., Paquot M., Brans A., Joris B., Arpigny J. L., Thonart P. (2007). Surfactin and fengycin lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of induced systemic resistance in plants. *Environ. Microbiol.* 9: 1084–1090.

Ongena M., Jourdan E., Adam A., Paquot M., Brans A., Joris B., Arpigny J. L., Thonart P. (2007). Surfactin and fengycin lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of induced systemic resistance in plants. *Environ. Microbiol.* 9: 1084–1090.

Ongena, M. et Jacques, P. (2008). *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends in Microbiology*, 16, 115-125. doi:10.1016/j.tim.2007.12.009.

Ors, S.,Suarez, D.L.(2017).Spinach biomass yield and physiological response to interactive salinity and water stress. *Agricultural water management* ;190, 31-41.

- Otto, M.** (2006). Bacterial evasion of antimicrobial peptides by biofilm formation. Dans: Antimicrobial Peptides and Human Disease (Shafer, W. M.). SpringerVerlag, Heidelberg, Germany. Pp 251-258.
- Panneton, B., C. Vincent et F. Fleurat-Lessard** .(2000). Place de la lutte physique en phytoprotection, pp. 1-24 in C. Vincent, B. Panneton et F. Fleurat-Lessard (Eds.) La lutte physique en phytoprotection, INRA Editions, Paris, 347 p. photo.
- Perry, L. M., & Metzger, J.** (1980). Medicinal plants of east and southeast Asia: attributed properties and uses. MIT press.,Cambridge, p. 78.
- Prescott L. M., Harley J. P., Klein D. A., 2003**, Microbiologie. De Boeck : Bruxelles.2ème édition.
- Tran G.**(2015). Azolla . Feedipedia, un programme INRAE, CIRAD, AFZ et FAO. <https://www.feedipedia.org/node/565> Dernière mise à jour le 19 octobre 2015, 14:31
- Turnbull ., PC., Kramer., JM et Melling, J.** (1996). Bacille. Microbiologie médicale .
- Rao, K.N.V., Tabassum, B., Babu, S.R., Yaja, A.,Banji, D.** (2015). Preliminary phytochemical screening of spinaciaoleracea L. World journal of pharmacy and pharmaceutical sciences.4, 532-551.
- Rappily.F.** (1968). Technique de mycologie en pathologie végétales. Ann epiphytes ;102p
- Reddy, M.K., Exander-Lindo. R.L., Nair, M.G.**(2005).Relative inhibition of lipid peroxidation, cyclooxygenase enzymes, and human tumor cell proliferation by natural food colors. J. Agric .Food .Chem;Nov 16;53(23):9268-73.
- Rodriguez-Zaragoza, S., Mayzlish, E., & Steinberger, Y.** (2005). Répartition verticale de la population d'amibes libres dans le sol sous les arbustes du désert dans le désert du Néguev, en Israël. Microbiologie appliquée et environnementale , 71 (4), 2053-2060.
- Romain Valade1, C. V.-G.-P.** (2010). Constitution d'une mycothèque des champignons pathogènes du blé tendre et mise au point d'outils permettant la caractérisation et la quantification de ces espèces .
- Rosa, M.P.G., Elisa, G.V.,Silvia., Patricia, P.C.** (2019). Spinacia oleracea Linn considered as one of the most perfect foods: a pharmacological and phytochemical review.Mini-Reviews in medicinal chemistry; Vol. 19, No. 20.
- Roughani, A., Miri, S.M., Kashi, A.K.,NaserianKhiabani, B.**(2017). Increasing the ploidy level in spinach (Spinaciaoleracea L.) using mitotic inhibitors.plant cell biotechnology and molecular biology 18(3&4):124-130.

Saba.S., Aroosh. S., Iftikhar. A . (2020). Thermostable acidic lipase of *Bacillus glycinifermentans*- MK840989 isolated from contaminated environment ; its optimization , purification and exploring potentiel applications . P 103-104.

Sallam M.A., Nashwa., Kamal A.M Abo-Elyousr. (2012). Evaluation of various plant extracts against the early-blight disease of tomato plants under greenhouse and field conditions. *Plants protect. Sci.*, 48 : 74-79.

Salvador, 1. E. (2005). Vertical Distribution of the Free-Living Amoeba Population in Soil. *Appl Environ Microbiol.*

Saraylou M., NADIAN GHOMSHEH., ENAYATIZAMIR, N., RANGZAN, N ST. CLAIR Senn, s. (2021). Some plant growth promoting traits of *Streptomyces* species isolated from various crop rhizospheres with high root colonization ability of spinach (*Spinacia oleracea* L.). *Applied Ecology and Environmental Research* · January 2021.

Schaechter,M. (2009). *Encyclopedia of Microbiology*, 3rd edition 3e ed. Elsevier, Academic Press, Amsterdam, Pays-Bas. 3496 pages.

Schleifer K.H. (2009) Phylum XIII. Firmicutes Gibbons and Murray 1978, 5 (Firmacutes [sic] Gibbons and Murray 1978, 5). In: Vos P, Garrity G, Jones D et al (eds) *Bergey's Manual® of systematic bacteriology*. Springer, New York, pp 19-1317.

Schroth MN., Hancock JG . (1981). Selected topics in biological control. *Annu Rev Microbiol* 34, 453-476 Schroth MN, Hancock JG ,1982. Disease suppressive soil and root colonizing bacteria. *Science* 216, 1376-1381. Université de Bourgogne, p.263.

Seigneurin-Berny, D. (2000). Recherche de nouveaux systèmes de transport à travers l'enveloppe du chloroplaste : caractérisation de nouvelles protéines hydrophobes. Thèse de doctorat en Biologie. Université Joseph Fourier, Grenoble, France. 191p.

Shiota.(2010).Protective effects of glycolipids extracted from spinach on 5-fluorouracil induced intestinal mucosal injury. *J. Med .Invest ; Aug;57(3-4):314-20.*

Slivinski, C. T., Mallmann, E., de Araújo, J. M., Mitchell, D. A., Krieger, N.(2012). Production of surfactin by *Bacillus pumilus* UFPEDA 448 in solid-state fermentation using a medium based on okara with sugarcane bagasse as a bulking agent. *Process Biochemistry*, 47, 1848–1855.

southern Brazil. *Res. Microbiol.* 159: 244–250.

Subhash, G.p., Virbhadrapp, S.R.,Vasant, O.K. (2010). *Spinaciaoleracea* Linn: A pharmacognostic and pharmacological overview. *Int.J.R.A.P.*; 1:78-84.

- Suty, L.** (2010). La lutte biologique: Vers de nouveaux équilibres écologiques. La lutte biologique, 1-328.
- TABAK, B. A.** (2011). L'activité antagoniste des bactéries lactiques (*Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium bifidum* et *Lactobacillus bulgaricus*) vis-à-vis de la souche *Helicobacter pylori* responsable des maladies gastroduodénales. *Nature & Technology*, (6), 71.
- Thonart, A. A.K.C.A.** (2013, OCTOBRE). In Vitro and In Vivo Characterization of Plant Growth Promoting Bacillus Strains Isolated from Extreme Environments of Eastern Algeria.
- Timsit, M. L.** (1992). échantillonnage de sols pour caractérisation d'une pollution : guide méthodologique . FRANCE.
- Toussaint, V.** (1996). Caractérisation d'un antibiotique produit par la souche d'actinomycète EF76 antagoniste à *Phytophthora fragariae* var. *rubi* causant le pourridié des racines du framboisier. Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada.
- Vandenbergh, P.A.**(2015), Iron-chelating compounds produced by soil pseudomads : correlation with fungal growth inhibition. *Appl. environ. Microbiol*, 46 PP. 128-132.
- Verma, S.**(2018). A study on medicinal herb *spinaciae oleraceae* Linn: *amaranthaceae*. *Journal of drugdelivery and therapeutics*; 8(4):59-61.
- Vieira Costa, b. C.** (2018). Potential of microalgae as biopesticides to contribute to sustainable agriculture and environmental development. *JOURNAL OF ENVIRONMENTAL SCIENCE AND HEALTH* , 1.
- Vijayalakshmi et al., K. S.** (2012). Isolation and Characterization of *Bacillus Subtilis* KC3 for Amylolytic Activity. *International Journal of Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics* , Vol. 2.
- Vouidibio Mbozo, A.** (2016). Identification génotypique et étude du potentiel fermentaire et probiotique des *Bacillus* du Ntoba mbodi. Thèse, Doctorat d'Etat. Université Marien Ngouabi.
- Wang, J., Li, R., Zhang, H., Wei, G., Li, Z.** (2020): Beneficial bacteria activate nutrients and promote wheat growth under conditions of reduced fertilizer application. – *BMC Microbiology* 20: 1-12.
- Yusuf, M., Chowdhury, J. U., Wahab, M. A.**(2009). Medicinal plants of bangladesh. Bangladesh council of scientific and industrial research, Dhaka 1205, Bangladesh, p231

Annexe

Annexe 1

Composition des milieux de cultures

1- Milieu gélose nutritive GN

- 20g de gélose nutritive déshydraté
- 1000ml d'eau distillée

2- Milieu PDA (Potato Dextrose d'Agar)

- 200g de pomme de terre découpés
- mis en ébullition dans un récipient contenant 500ml d'eau distillée pendant 30 minute
- 20g de glucose
- 15g d'agar
- complété à 1000ml par l'eau distillée

3- Milieu amylolytique

- Peptone 5g
- Amidon (1%) 10g
- Agar 10g
- eau distillée 1000ml

4- Milieu lipolytique

- peptone 10g
- NaCl₂ 5g
- CaCl₂ 0,1g
- Agar 20g
- Tween-80 10ml

- Twee- 20 10ml

- 1000ml d'eau distillée

5- Milieu protéolytique

- bouillon nutritif 8g

- glucose 1g

- Agar 18g

- 15ml lait écrémé

6- Milieu Chitinase

- 0,3g de $MgSO_4$

- 3g de $(NH_4)_2SO_4$

- 2g de KH_2PO_4

- 1g d'acide citrique monohydrate

- 15g de gélose

- 200 μ l de Tween-80

- 4,5g de colloïdal chitine

- 0,15g de pourpre de bromocrésol

7- Milieu Landy

- 20g de glucose

- 5g d'acide L-glutamique

- 0,5g de $MgSO_4$

- 0,5g de KCL

- 1g de KH_2PO_4

- 0,0012g de $Fe_2(SO_4)_3$

- 0,0004g de MnSO_4

- 0,0016g de CuSO_4

8- milieu alternatif (Azolla)

La préparation du milieu consiste à sécher la plante d'Azolla puis le broyer afin d'obtenir une poudre, ensuite on met dans un bécher contenant 1L d'eau distillée et 40g du poudre et le mettre dans un agitateur magnétique jusqu'à le point d'ébullition.

9- Eau physiologique

- 9g/l du NaCl

- 1000ml d'eau distillée

Annexe 2

Méthode de calcul par cellule de Mallassez

Formule à appliquer :

Nombre de cellules par
unité de volume

Nombre de
cellules
comptées

Facteur de
dilution

$$N = \frac{n}{a.v} \times Fd$$

nombre de cellules par unité de volume

Nombre d'unités de
comptage dénombrées

Volume d'une unité de comptage

Annexe 3

Lyophilisateur



Université Frères Mentouri Constantine 1
Département de Biologie Appliquée

Présenté par : Bouzreaib Abdelatif et Mekiou Meriem
Date de soutenance : 22/ 06/ 2022

Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master en Bio-industrie Analyse et Contrôle

Thème : *Bacillus* une potentiel rhizobactérie favorisant la croissance de plantes

Résumé

L'exploration des échantillons du sol de la zone de la rhizosphère des plantes de l'épinard de la région de Ain Ben Sbaa, Hamma Bouziane (Constantine), a abouti à douze isolats bactériens. Une bactérie appartenant au genre *Bacillus* a été sélectionnée, *in vitro*, par la technique de confrontation par contacte directe contre les agents phytopathogènes de l'épinard. L'exploitation des échantillons présentant des symptômes de maladies fongiques de l'épinard de la région de Dababya, Hamma Bouziane (Constantine) a permis d'obtenir trois isolats fongiques. L'identification morphologique de ces isolats a révélé qu'ils s'agit de *Cladosporium sp.*, d'*Alternaria sp.* et de *Pythium sp.* Le test de phytopathogénicité de moisissures : *Cladosporium sp.*, d'*Alternaria sp.* et de *Pythium sp.* sur des plantules de tomate a abouti un degré de sévérité de 76%. L'agent antagoniste sélectionné B1 a révélé un taux d'inhibition variant entre 48% et 58%. Cependant la bactérie B1 a développé un meilleur effet d'inhibition vis-à-vis *Alternaria sp.* L'identification morphologique et les tests biochimiques de l'isolat bactérien sélectionné ont montré que la souche est *Bacillus sp.* Le test *in vivo* a été effectué en condition de pots sur des plantules de tomate a révélé une capacité intéressante de la souche sélectionnée *Bacillus sp.* de stimulation et de bio contrôle. La souche de *Bacillus sp.* sélectionnée est capable de sécréter des enzymes de dégradation de la paroi fongique, dont les protéases, les chitinases, les lipases et les amylases. En effet, il est à mettre en exergue que, le présent travail est le premier à avoir la possibilité de produire la biomasse de *Bacillus sp.* et les métabolites sur un milieu alternatif riche en matière première, disponible et en faible coût, et qui est à base d'*Azolla*. Une étude comparative sur son développement et sur sa capacité de production de biomasse et de métabolites dans des conditions de cultures différentes à savoir ; milieu landy et milieu alternatif à base d'*Azolla*. En effet, *Bacillus sp.* capable à se développer dans les deux milieux, cependant, son développement est beaucoup plus important sur le milieu alternatif ($8,4 \times 10^7$ cellule/mL), comparativement au milieu landy les valeurs sont inférieures.

Mots-clés : Epinard, *Bacillus*, *Cladosporium*, *Alternaria*, test antagoniste, test *in vivo*, fermentation.

Laboratoire de Recherche : Laboratoire de Microbiologie N=° 14, UMC1.

Présidente : Dr. Harzallah Bisma MCB- Université Frères Mentouri, Constantine 1.

Encadreur : Dr. Milet Asma MCB - Université Frères Mentouri, Constantine 1.

Examineur : Dr. Betaiche Insaf MCB - Université Frères Mentouri, Constantine 1.

