

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 Microbiologie

كلية علوم الطبيعة والحياة  
قسم الميكروبيولوجيا

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

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : science biologique

Spécialité : Mycologie et biotechnologie fongique (MBF)

N° d'ordre :

N° de série :

Intitulé :

---

**Recherche de nouvelle souche productrice de substances  
antimicrobiennes à partir du sol de la zone de la rhizosphère**

---

Présenté par : BOUDERSA RANIA  
BOURAS AYA MARWA  
EL KRIMI RAHMA

Le 26/06/2022

Jury d'évaluation :

Encadreur : Dr. Milet Asma (M.C.B - Université Frères Mentouri, Constantine 1).

Examineur 1 : Dr. Cherfia Radia (M.C.B - Université Frères Mentouri, Constantine 1).

Examineur 2 : Dr. Benserradj Ouafa (M.C.A – Université Mila).

Année universitaire  
2021 – 2022

## *Remerciements*

*Avant tout nous remercions Allah tout puissant de nous avoir accordé la force, le courage et les moyens afin de pouvoir accomplir ce modeste travail.*

*Au terme de ce travail nous tenons à exprimer nos vifs remerciements et notre profonde gratitude à notre encadreur Mme Milet Asma, docteur à L'université des frères Mentouri Constantine1. Pour avoir bien voulu nous diriger dans la réalisation de ce mémoire, pour sa disponibilité et ses précieux conseils mais également pour la motivation qu'elle nous a apportée tout au long de cette étude, sans qui ce mémoire n'aurait jamais vu le jour*

*Comme nous remercions également les membres du jury :*

*Mme Cherfia Radia et Mme Benserraj Ouafa, professeurs à L'université des frères Mentouri Constantine1, d'avoir accepté d'examiner ce travail*

*Nous tenant également à exprimer nos remerciements à tout le corps enseignant de L'université des frères Mentouri Constantine1.*

*Nous sommes reconnaissantes à toutes personnes qui a Contribué de près ou de loin à la réalisation de ce mémoire par leurs aides et encouragements.*

# *Dédicace*

*J'ai le grand plaisir de dédier ce travail :*

*A mes très chers grands parents Abdallah et Zoubida, pour ses encouragements, ses soutiens et surtout leurs amours. Que dieu leurs donne une longue et joyeuse vie.*

*A mes chers parents Lazhar et Nadira, qui me donnent toujours l'espoir de vivre, pour leurs tendresses, leurs sacrifices et leurs conseils précieux tout au long de mes études.*

*A mes sœurs Khadidja, Sara, et Meriem pour leurs encouragements et leurs soutiens moraux, sans oublier mes nièces Mirale et Maria que j'aime beaucoup.*

*A toute ma famille (oncles, tantes, cousins et cousines) chacun par son nom, grand et petit.*

*A mes meilleures amies Nibel, Meriem, Amani, Aridj, Racha, Rawnek et Rania qui n'ont jamais cessées de m'aider, et qui je leurs souhaite beaucoup de succès, réussite, bonheur et santé dans leurs vies.*

*Et bien sur le grand merci à (Rania, Rahma) qui m'ont aidé à réalisé ce modeste travail qui j'espère servira à notre pays dans un avenir proche.*

*A celles et ceux qui m'aiment et me respectent.*

*Et enfin à toutes personnes que j'aime.*

**BOURAS AYA MARWA**

## *Dédicace*

*Je dédie ce modeste travail*

*À l'homme de ma vie, mon exemple éternel, l'épaule solide, celui qui s'est toujours sacrifié pour me voir réussir, à toi mon père **Noureddine** aucune dédicace ne serait exprimer mes sentiments, que dieu te préserve et te procure santé et longue vie.*

*À la lumière de mes jours ma mère **Ilham**, tu m'as donné la vie, la tendresse et le courage pour réussir. Tout ce que je peux t'offrir ne pourra exprimer l'amour et la reconnaissance que je te porte, je t'aime maman, que dieu te préserve et te procure santé et longue vie.*

*À la mémoire de mon grand-père **Amour** que dieu lui garde dans son vaste paradis.*

*À mes chers frères : **Abdel Raouf** et **Radouane**.*

*À mes chères sœurs : **Soumia** et **Djihad**.*

*À mes chers **neveux** et **nièces**, que votre vie soit comblée de joie bonheur et réussite, je vous aime beaucoup.*

*À ma sœur et mon amie d'enfance **Meriem** avec qui j'ai passé les bons et les mauvais moments de ma vie, je te souhaite bonheur et santé.*

*Tout spécialement, je remercie ma chère amie **MEKIOU Meriem**, pour sa présence dans mes moments les plus difficiles, aussi pour son soutien moral et ces encouragements.*

*A mes binômes : **Rania** et **Aya**.*

*Enfin Un grand merci à moi d'avoir été là pour moi on a fait un long chemin plein de souffrance et des moments difficiles, tu ne m'as jamais abandonné merci, je suis Fière de moi, je m'aime.*

*EL KRIMI Rahma*

# *Dédicace*

*Avec l'expression de ma reconnaissance, je dédie ce modeste travail à :*

*A ma très chère mère «Rachida» Affable, honorable, aimable qui a été toujours présente avec beaucoup d'amour et tendresse dans les moments les plus importants de ma vie: tu représentes pour moi le symbole de la bonté par excellence, la source de tendresse et l'exemple du dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi.*

*A mon très chère père «Larbi» : Merci mon père de m'avoir donné le soutien tout le temps, et de m'avoir guidée et orientée tout au long de ma vie, avec tous mes respects et ma reconnaissance pour les grands sacrifices consentis au service de la famille.*

*A mes fidèles compagnons dans les moments les plus délicats de cette vie*

*Mystérieuse mes très chères sœurs: Haná, Amel, Nadjet et mes frères : Hicham et Nasser Eddine*

*A mes baux frères : Bilel, Walid, Djamel*

*Ames belles sœurs : Asma, Assala*

*A Mes neveux et mes nièces que votre vie soit remplie de joie et de bonheur, je vous aime tellement*

*A mes très chères amies qui ont partagé avec moi ce travail : Rama et Maroua*

*Merci pour votre sacrifice dans toutes les conditions défavorables. Merci à nous.*

*A ma très chère amie Chaima qui a partagé avec moi les moments heureux et pénibles durant cette année*

*A mes chères proches qui m'ont donné leur aide, soutien et beaucoup de courage et d'amour dans les moments difficiles et pour les baux souvenirs qui ont créé ensemble durant cette vie*

*A toutes mes amies et mes collègues de cette promo*

*A toute la famille Boudersa. A tous qui sont chères. À tous ceux qui m'aiment.*

**BOUDERSA RANIA**

## Table des matières

1- Introduction.....	01
2- Revue bibliographique.....	04
2.1- Pomme de terre .....	04
2.1.1- Historique.....	04
2.1.2- Nomenclature et classification .....	04
2.1.3- Importance de la pomme de terre dans le monde.....	05
2.1.4- Importance de la pomme de terre en Algérie.....	06
2.1.5- Description botanique.....	07
2.1.6- Caractéristique de la pomme de terre.....	08
2.1.6.1- Caractéristiques du tubercule.....	08
2.1.6.2- Composition biochimique du tubercule.....	09
2.1.7- Physiologie et multiplication de la pomme de terre.....	10
2.1.7.1- Reproduction sexuée.....	10
2.1.7.1- Reproduction végétatif.....	10
2.2- Agents phytopathogènes.....	10
2.2.1- Maladies fongiques.....	10
2.2.1.1- Altérnariose ( <i>Alternaria alternata</i> ).....	10
2.2.1.2- La pourriture aqueuse ( <i>Pythium spp</i> ).....	11
2.2.1.3- Le mildiou ( <i>Phytophthora infestans</i> ).....	12
2.2.1.4- La fusariose ( <i>Fusarium spp</i> ).....	13
2.2.1.5- La pourriture rose ( <i>phytophthora erythroseptica</i> ).....	14
2.2.1.6- La gale argentée ( <i>Helminthosporium solani</i> ).....	15
2.2.2- Les maladies bactériennes.....	16
2.2.2.1- La jambe noire ( <i>Pectobacterium spp</i> ).....	16
2.2.2.2- Gale commune ( <i>Streptomyces scabiei</i> ).....	17
2.2.2.3- Flétrissement bactérien ( <i>Corynebacterium sepedonicum</i> ).....	18
2.2.3- Les maladies virales.....	19
2.2.3.1- Le Calicot (Virus de la mosaïque de la luzerne).....	19
2.2.3.2- Enroulement de la pomme de terre (Virus de l'enroulement de la pomme de terre)	20
2.2.3.3- Virus du Ratttle.....	20
2.3- Lutte contre les agents phytopatogènes.....	21
2.3.1- Lutte physique.....	21

2.3.2- Lutte génétique.....	21
2.3.3- Méthodes culturales.....	21
2.3.4- Lutte chimique.....	22
2.3.5- Lutte biologique.....	22
2.4- Agent antagoniste.....	22
2.4.1- Genre <i>Bacillus spp</i> .....	23
2.5- Rhizosphère.....	23
2.5.1- Interactions entre les microorganismes de la rhizosphère.....	24
2.5.1.1- Commensalisme.....	24
2.5.1.2- Parasitisme.....	24
2.5.1.3- Antagonisme.....	24
3-Matériel et méthodes.....	25
3.1- Isolement des agents phytopathogènes.....	25
3.1.1- Échantillonnage.....	25
3.1.2- Isolement.....	26
3.1.3- Purification .....	27
3.1.4- Identification de l'agent phytopathogène.....	27
3.1.4.1- Observation macroscopique.....	27
3.1.4.2- Observation microscopique.....	27
3.1.5- Test de phytopathogénicité.....	28
➤ Calcul de la sévérité de la maladie.....	29
➤ Ré-isolément de l'agent pathogène.....	29
3.2- Isolement de l'agent antagoniste.....	29
3.2.1- Echantillonnage.....	30
3.2.2- Isolement.....	30
3.2.3- Purification.....	31
3.3- Sélection des agents antagonistes.....	31
3.3.1- Confrontation par contact direct sur milieu de culture.....	32
3.3.2- Test de thermo-résistance.....	32
3.4- Identification de microorganismes sélectionnés.....	32
3.4.1- Observation macroscopique.....	33
3.4.2- Observation microscopique.....	33
➤ Observation à l'état frais.....	33

➤ Coloration au bleu de méthylène.....	33
➤ Coloration de Gram.....	34
3.4.3-Tests biochimiques (les tests d'orientations).....	34
➤ Test catalase.....	34
➤ Etude de la fermentation du mannitol (test du mannitol mobilité).....	35
➤ La galerie Api 20 E.....	35
3.5-Test de biocontrôle.....	36
3.6- Détection des enzymes de dégradation de la paroi fongique.....	36
➤ Activité amylolytique.....	36
➤ Activité protéolytique.....	37
➤ Activité lipolytique.....	37
➤ Activité chitinase.....	37
3.7- Fermentation en milieu alternatif à base de farine de noyaux de datte	37
3.7.1- Milieu de culture.....	37
3.7.2- Préparation de l'inoculum.....	38
3.7.3- Culture bactérienne.....	38
3.7.4- Évaluation des paramètres de croissance et de production de Métabolites.....	38
➤ Evaluation de la biomasse.....	38
➤ Analyse des métabolites.....	38
3.8- Activité antibactérienne.....	39
3.8.1- Méthode des puits (méthode de Barefoot et Kaenhammer, 1983).....	39
3.8.2- Lecture.....	40
3.9- Lyophilisation.....	40
4- Résultats.....	41
4.1- Isolement des agents phytopathogènes.....	41
4.2- Identification des agents phytopathogènes.....	41
4.2.1- Observation macroscopique.....	41
4.2.2- Observation microscopique.....	45
4.3- Test de phytopathogénicité.....	47
➤ Réisolement de l'agent phytopathogène.....	48
4.4- Isolement de l'agent antagoniste.....	49
4.4.1- Sélection de l'agent antagoniste.....	49



➤ Confrontation par contact direct .....	49
➤ Etude microscopique de l'interaction d'antagonisme .....	53
4.4.2- Test de thermo-résistance.....	55
4.5- Identification des microorganismes sélectionnés.....	55
4.5.1- Aspect macroscopique.....	55
4.5.2- Aspect microscopique.....	55
4.6- Tests biochimiques .....	57
4.6.1- Test catalase.....	57
4.6.2- Test de mannitol mobilité.....	57
4.6.3- La galerie Api 20 E.....	58
4.7- Test enzymatique.....	59
4.8- Test de biocontrôle.....	61
4.9- Fermentation en milieu alternatif à base de farine de noyaux de dattes	64
4.9.1 – Evaluation de la biomasse.....	65
4.9.2 – Analyse de métabolite.....	67
4.10- Test antibactérien.....	68
4.11- Lyophilisation.....	71
5- Discussion.....	72
6- Conclusion.....	76
7- Abstract.....	78
8- ملخص.....	79
9- Références bibliographique.....	80
10-Annexe	

## Liste des figures

N°	Titre	Page
<b>Figure 1</b>	Répartition de la pomme de terre par continent (UNPT, 2009).....	5
<b>Figure 2</b>	Principaux producteurs de la pomme de terre au monde en 2016 (FAO stat, 2018).....	6
<b>Figure 3</b>	Production de la pomme de terre en Algérie (Bessaoud et Lefki, 2018).....	7
<b>Figure 4</b>	Plante de pomme de terre. (FAO, 2015).....	8
<b>Figure 5</b>	la composition biochimique d'un Tubercule de pomme de terre ( <i>Solanum tuberosum</i> L). Les valeurs sont exprimées en pourcentage de la matière fraîche totale (FAO, 2008).....	9
<b>Figure 6</b>	Symptômes de l'alternariose sur la pomme de terre (Kerr, 2014).....	11
<b>Figure 7</b>	Symptômes causés par <i>Pythium spp</i> (Kerr, 2014).....	12
<b>Figure 8</b>	Symptômes causés par <i>Phytophthora infestans</i> . (Kerr, 2014).....	13
<b>Figure 9</b>	Symptômes causés par <i>Fusarium solani</i> (Kerr, 2014).....	14
<b>Figure 10</b>	Symptômes de la pourriture rose (Kerr, 2014).....	15
<b>Figure 11</b>	Symptômes causés par <i>Helminthosporium solani</i> (Kerr, 2014).....	16
<b>Figure 12</b>	Symptômes causés par la jambe noire (Kerr, 2014).....	17
<b>Figure 13</b>	Symptômes causés par la jambe noire (Kerr, 2014).....	17
<b>Figure 14</b>	Symptômes causés par <i>Streptomyces scabiei</i> (Kerr, 2014).....	18
<b>Figure 15</b>	Symptômes de flétrissement bactérien (Kerr, 2014).....	19
<b>Figure 16</b>	Sites d'échantillonnage de l'agent phytopathogène à partir de la région d'El Harrouche (Skikda).....	25
<b>Figure 17</b>	Symptômes de maladies phytopathogènes sur feuilles et tiges de la pomme de terre.....	26
<b>Figure 18</b>	Sites d'échantillonnage à partir de la région d'Ain Bouziane de Skikda.....	29
<b>Figure 19</b>	Localisation géographique de la région Ain Bouziane.....	29
<b>Figure 20</b>	Sols et sites d'échantillonnage : (A, B) Zone de la rhizosphère d'une plantule saines de la pomme de terre située à Ain Bouziane de Skikda.....	30
<b>Figure 21</b>	Méthode de dilution à partir du sol de la zone de la rhizosphère de plantules saines de la pomme de terre.....	31
<b>Figure 22</b>	Aspect macroscopique de l'isolat fongique M1 après le 3,5 et le 7ème jour d'incubation à 30 °C sur milieu PDA.....	42
<b>Figure 23</b>	Aspect macroscopique de la souche M2 après le 3,5 et le 7 <sup>-ème</sup> jour d'incubation	

	à 30°C sur milieu PDA.....	42
<b>Figure 24</b>	Aspect macroscopique de la souche A1 après le 3, 5 et 7 <sup>ème</sup> jour d'incubation à 30°C sur milieu PDA.....	43
<b>Figure 25</b>	Aspect macroscopique de la souche A3 après 3,5 et le 7 <sup>ème</sup> jour d'incubation à 30°C sur milieu PDA.....	44
<b>Figure 26</b>	Aspect macroscopique de la souche A4 après le 3,5 et le 7 <sup>ème</sup> jour d'incubation à 30°C sur milieu PDA.....	44
<b>Figure 27</b>	Etude microscopique de l'isolat filamenteux M1 GX 40.....	45
<b>Figure 28</b>	Etude microscopique de l'isolat filamenteux M2 GX 40.....	45
<b>Figure 29</b>	Etude microscopique de l'isolat filamenteux A1 GX 40.....	46
<b>Figure 30</b>	Etude microscopique de l'isolat filamenteux A3 GX 40.....	46
<b>Figure 31</b>	Etude microscopique de l'isolat filamenteux A4 GX 40.....	47
<b>Figure 32</b>	Symptômes apparaissent après 20 jours d'inoculation par : (A) <i>Pythium sp1</i> . (B) <i>Pythium sp2</i> . (C) <i>Alternaria sp</i> . (D) <i>Aspergillus sp1</i> . (E) <i>Aspergillus sp2</i> . et (F) Témoin.....	47
<b>Figure 33</b>	Aspect macroscopique des isolats bactériens sélectionnés B1 et B15.....	55
<b>Figure 34</b>	Coloration de Gram des bactéries sélectionnées sous microscope A : B1, B : B15 (G X40).....	56
<b>Figure 35</b>	Coloration simple des bactéries sélectionnées sous microscope A : B1, B : B15 (GX40).....	56
<b>Figure 36</b>	Résultats du test catalase des deux bactéries antagonistes B1 et B15 respectivement.....	57
<b>Figure 37</b>	Résultat du test mannitol mobilité des deux bactéries B1, B15 et le témoin.....	57
<b>Figure 38</b>	Résultats d'Api 20 E (A, B) témoin ; (C, D) résultats après 24h d'incubation à 30°C ; et (E, F) résultats après 48h d'incubation à 30°C.....	58
<b>Figure 39</b>	Le développement des bactéries B1 et B15 sur milieu à base de farine de noyaux de dattes.....	64
<b>Figure 40</b>	Courbes de croissance des souches B1 sur différents milieux de culture pendant 72 heures d'incubation à 30°C.....	65
<b>Figure 41</b>	Courbes de croissance des souches B15 sur différents milieux de culture pendant 72 heures d'incubation à 30°C.....	66
<b>Figure 42</b>	La courbe de production des métabolites de la souche B1 sur différents milieux de culture pendant 72heures d'incubation à 30°C. ....	67
<b>Figure 43</b>	La courbe de production des métabolites de la souche B15 sur différents milieux de culture pendant 72heures d'incubation à 30°C.....	68

## Liste des tableaux

N°	Titre	Page
<b>Tableau 1</b>	Position systématique de la pomme de terre.....	<b>4</b>
<b>Tableau 2</b>	Classification du genre <i>Bacillus</i> .....	<b>23</b>
<b>Tableau 3</b>	Les différentes bactéries tests et leurs code ATCC.....	<b>39</b>
<b>Tableau 4</b>	Le pourcentage de sévérité des maladies causées par les agents phytopathogènes.....	<b>48</b>
<b>Tableau 5</b>	Résultats de ré isolement des agents phytopathogènes.	<b>48</b>
<b>Tableau 6</b>	Inhibition <i>in vitro</i> de la croissance des agents phytopathogènes ( <i>Pythium sp1</i> , <i>Pythium sp2</i> , <i>Alternaria sp.</i> , <i>Aspergillus sp1</i> , <i>Aspergillus sp2</i> ) par les isolats bactériens (B1, B15) après 10 jours.....	<b>50</b>
<b>Tableau 7</b>	Taux d'inhibition de la croissance mycélienne par confrontation directe.....	<b>51</b>
<b>Tableau 8</b>	Etude de l'interaction entre bactéries et moisissures phytopathogènes.....	<b>52</b>
<b>Tableau 9</b>	Caractères macroscopiques des isolats bactériens (B1 et B15).....	<b>53</b>
<b>Tableau10</b>	Caractères microscopiques des isolats bactériens (B1 et B15).....	<b>54</b>
<b>Tableau11</b>	Résultats de la galerie Api20E après 48h d'incubation à30°C des deux bacteries B1 et B15.....	<b>56</b>
<b>Tableau12</b>	Résultats de L'activité enzymatique des bactéries B1 et B15.....	<b>57</b>
<b>Tableau13</b>	la taille, le nombre de feuilles et les symptômes des plantules de tomates inoculé par <i>Bacillus sp1</i> et <i>Bacillus sp 2</i> et le temoin.....	<b>58</b>
<b>Tableau14</b>	Effet du traitement sur des plantules de tomate (variété : blacmine) par les différentes souches ( <i>Bacillus sp1</i> , <i>Bacillus sp2</i> ) dans des conditions de pots après 20 jours d'inoculation par l'agent phytopathogène.....	<b>60</b>
<b>Tableau15</b>	Détermination de la matière sèche.....	<b>63</b>
<b>Tableau16</b>	Résultats du test antibactérien après 24h d'incubation.....	<b>66</b>
<b>Tableau 17</b>	Présente les longueurs des zones d'inhibition.....	<b>67</b>

## Liste des abréviations

<b>B :</b>	biomasse.
<b>°C :</b>	degré Celsius.
<b>CaCl :</b>	Chlorure de calcium.
<b>Cm :</b>	Centimètre.
<b>FAO :</b>	Food and Agriculture Organization.
<b>g :</b>	gramme.
<b>GN :</b>	Gélose Nutritive.
<b>h :</b>	Heure.
<b>HCl :</b>	Chlorure d'hydrogène.
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> :</b>	peroxyde d'hydrogène.
<b>H<sub>2</sub>O :</b>	Eau.
<b>Kcals :</b>	Kilocalories.
<b>L :</b>	litre.
<b>Met :</b>	Métabolites.
<b>Mg :</b>	Milligramme.
<b>Min :</b>	Minute.
<b>ml :</b>	Millilitre.
<b>ML:</b>	Milieu Landy.
<b>µl :</b>	microlitre.
<b>Mm :</b>	Millimètre.
<b>µm:</b>	micromètre.

**MND:** milieu noyaux de datte.

**MO:** milieu optimum.

**NaCl:** Chlorure de sodium.

**nm:** nanomètre.

**Oz:** Oxygène.

**ONS :** Office National des Statistiques.

**PDA:** Potato Dextrose Agar.

**P:** pourcentage.

**PH:** potentiel d'Hydrogène.

**rpm:** tour par minute.

**SPSS:** Statistical package for the social sciences.

**V:** Volume.

# *Introduction*

## **1. Introduction**

La pomme de terre (*Solanum tuberosum L.*) appartient à la famille des *Solanacées* et au genre *Solanum* qui est une plante à fleur, désignée comme une plante vivace, dicotylédone, tubéreuse et herbacé (NGOYI *et al.*, 2020). C'est une plante annuelle d'origine sud-américaine. Elle a été découverte au Pérou pour la première fois en 1533, en Europe en 1534, puis en Algérie qu'elle a été introduite pour la première fois au XVI<sup>ème</sup> siècle par les Maures andalous qui ont propagé les autres cultures dans la région telles que : tomate, poivron, maïs et tabac (Rousselle *et al.*, 1996).

La pomme de terre est parmi les quatre cultures alimentaires les plus importantes au niveau mondial après le blé, le riz et le maïs (CNCC, 2013). Elle joue un rôle important dans l'économie de nombreux pays, et peut présenter une solution aux problèmes de déficit alimentaire mondial (Rajnachel, 1987). Elle occupe une place considérable dans l'alimentation de base des populations dans les pays en développement. Sa culture offre de nombreux atouts : d'un point de vue agronomique, sa culture est aisée, son potentiel de rendement est important (NGOYI *et al.*, 2020). Du point de vue nutritionnel, elle se classe parmi les plantes à tubercule les plus nutritives avec une teneur énergétique élevée. Du point de vue commercial, elle est très appréciée par les populations congolaises. Certaines études démontrent qu'en Algérie par exemple, la production nationale de la pomme de terre s'est établie à 46,06 millions de (qx) en 2017 pour une valeur de 234,28 millions de DA, avec un rendement de 308,8 qx/hectare, a indiqué le ministère de l'Agriculture, du développement rural et de la pêche dans un communiqué (FAO, 2017).

Les plantes sont attaquées par nombreux bio-agresseurs, ces attaques sont à l'origine du manque de production de la pomme de terre. Parmi eux, les moisissures phytopathogènes qui provoquent plusieurs maladies sur tous les organes telles que : l'Alternariose, le mildiou, le fusariose, la pourriture aqueuse, la gale commune et le virus du rattle...etc. Afin de réduire les pertes de rendement sur les plantes d'intérêt agricole, des méthodes de lutte classique, telles que l'utilisation de la résistance des plantes et l'application de fongicides chimiques, sont mises en œuvre (Moenne-Loccoz *et al.*, 1998). Malgré l'utilisation de ces derniers est efficace, ils ont des effets néfastes pour les écosystèmes et par conséquent pour la santé de l'animal et de l'homme (Rachel, 1962). En effet, ils sont responsables de nombreux effets



toxiques secondaires causant des risques potentiels pour l'environnement, Et leur utilisation intensive affecte la fertilité du sol (Relyea, 2009).

Face à l'aggravation des problèmes de lutte contre les maladies phytopathogènes, des recherches sérieuses sont nécessaires pour identifier d'autres méthodes alternatives pour la protection des végétaux, qui dépendent moins de substances chimiques et qui sont plus respectueux à l'environnement. La lutte biologique est l'une des méthodes prometteuses, qui consiste à combattre une maladie causée par un organisme au moyen d'un autre organisme (Corbaz, 2003). Parmi ces microorganismes les bactéries que l'on trouve naturellement dans le sol de la zone de la rhizosphère qui correspond à la zone du sol dans laquelle la microflore tellurique est soumise aux influences des racines, sont les meilleurs candidats pour appliquer en forme de cellules vivantes. Ils sont connus pour leur production de métabolites bioactifs tel que : *Bacillus*, *Streptococcus*, *Pseudomonas* (Campbell et Greaves 1990; Wastover *et al.*, 1997). Peut-être l'absence de l'utilisation de ce mode de traitement est limitée par le cout élevé de leur fabrication. De ce fait, dans le présent travail un nouveau milieu de culture fabriqué à partir de matières premières disponibles et moins cher a été proposé et qui est un milieu alternatif à base de farine de noyau de datte. Le choix de ce dernier a été effectué grâce à sa richesse en matière première, une bonne source de : glucide, cellulose brut, matière grasse, protéine, et des minéraux.

Ainsi, nous avons fixé comme objectif dans ce travail, l'isolement et l'identification de souches antagonistes, isolées à partir du sol de la zone de la rhizosphère de la pomme de terre de la région d'El Harouche, située à la wilaya de Skikda. Et ce pour les utiliser comme agent de bio-contrôle en agriculture contre des agents phytopathogènes isolées et sélectionnées à partir de différents échantillons, feuilles, tiges et fruits de plantes de la pomme de terre de la région d'El Harouche de Skikda, présentant les symptômes de maladies, en l'occurrence : *Pythium sp1*, *Pythium sp2*, *Aspergillus sp1*, *Aspergillus sp2* et *Alternaria sp*. D'autre part, nous avons étudié, l'effet antagoniste de ces agents sur les agents phytopathogènes par la méthode de confrontation par contact direct sur milieu de culture avec une étude microscopique de l'interaction entre les agents phytopathogènes et les agents antagonistes ; Par la suite un test *in vivo* a été réalisé pour évaluer l'effet protecteur de ces derniers sur les plantules de tomate infectés par des moisissures phytopathogènes obtenues ; en outre, une autre partie concentrée sur la caractérisation des souches performantes et ses capacités à produire des enzymes

hydrolytiques (protéase, amylase, lipase et chitinase); alors que la dernière partie porte sur l'évaluation de la biomasse et les métabolites des souches performantes sur trois milieux à savoir : optimum, landy et un milieu alternatif à base de farine des noix de dattes avec un test antimicrobien pour vérifier la capacité des souches obtenues de produire des métabolites antimicrobiens.

# *Revue bibliographique*

## 2- Revue bibliographique

### 2.1- Pomme de terre

#### 2.1.1-Historique

L'histoire de la pomme de terre a commencé avec des espèces sauvages très similaires à la pomme de terre cultivée aujourd'hui. Ces dernières sont largement distribuées dans les pays de l'Amérique du Sud notamment au Sud du Chili et les États-Unis, mais les premières pommes de terre cultivées sans doute, ont été sélectionnées par les populations dans les Andes centrales du Pérou et quelque part dans la Bolivie (Spooner et Hetterscheid, 2006).

Elle fut introduite en Europe vers la deuxième moitié du 16ème siècle, mais cultivée jusqu'à la fin du 18 ème siècle sur une faible étendue. Nous pouvons constater son expansion prodigieuse durant le 19 ème siècle en Europe (Houidi et Ahmadi, 2007).

#### 2.1.2- Nomenclature et classification

La pomme de terre (*Solanum tuberosum* L.) est une plante tubéreuse, herbacée et vivace appartenant à la famille des *Solanaceae* (Moulen, 2013).

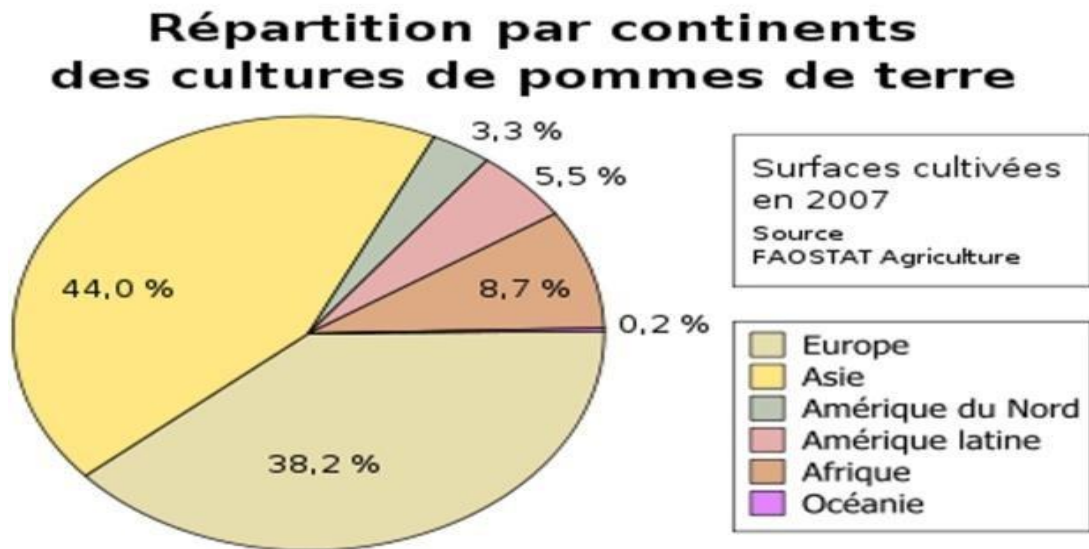
Selon (Boumlik, 1995), la position systématique de la pomme de terre est la suivante :

**Tableau 1** Position systématique de la pomme de terre.

<b>Embranchement</b>	Angiospermes
<b>Classe</b>	Dicotylédones
<b>Sous classe</b>	Gamopétales
<b>Ordre</b>	Polmoniales
<b>Famille</b>	Solanacées
<b>Genre</b>	<i>Solanum</i>
<b>Espèce</b>	<i>Solanum tuberosum</i> L.

### 2.1.3-Importance de la pomme de terre dans le monde

La pomme de terre est la principale denrée alimentaire non céréalière dans le monde et la quatrième production vivrière après le riz, le blé et le maïs. Ainsi jusqu'au début des années 90, elle était cultivée et consommée essentiellement en Amérique du nord et dans les pays de l'Exen Europe. Depuis, la production et la demande ont enregistré une forte croissance en Asie, en Afrique et en Amérique Latine (figure 1) (UNPT, 2009).

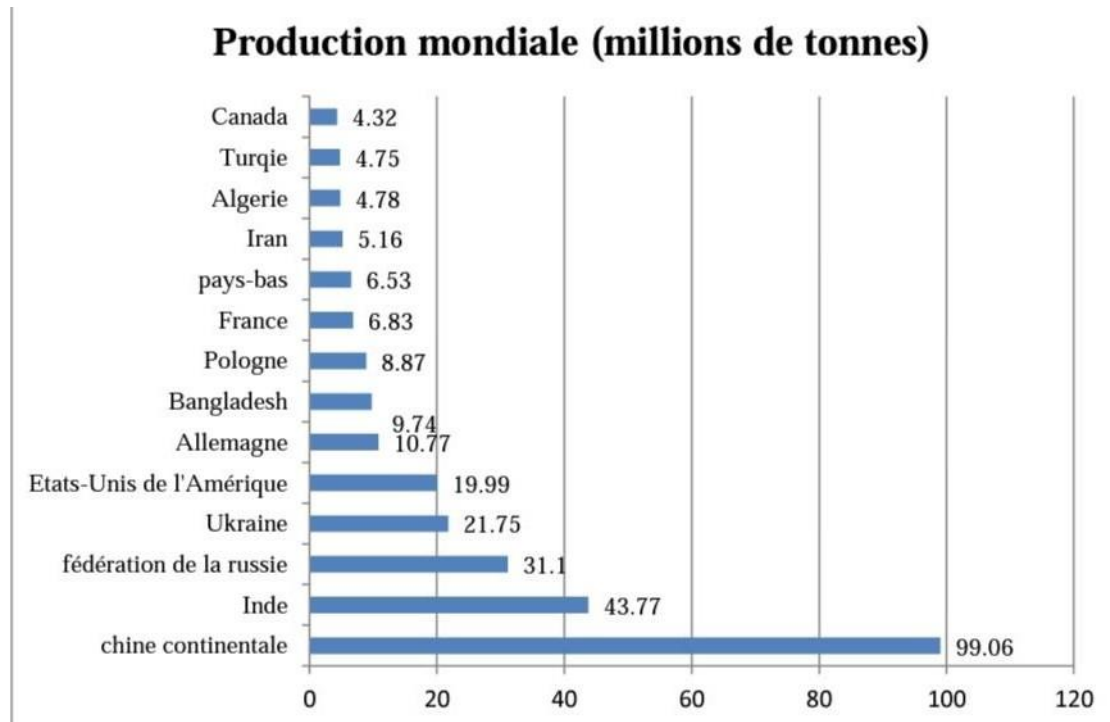


**Figure 1** La répartition de la pomme de terre par continent (UNPT, 2009).

C'est le légume le plus consommé dans le monde, Elle joue un rôle important dans l'économie de nombreux pays, et peut présenter une solution aux problèmes de déficit alimentaire mondial (Rajnachel, 1987).

En 2013, la production mondiale de pomme de terre est estimée à 368.1 millions de tonnes, pour une surface cultivée de 19.4 millions d'hectares, soit un rendement moyen de 18.9 tonnes par hectare. Ce chiffre n'inclut pas les plants (semences) qui représentent 32.2 millions de tonnes (Rajnachel, 1987).

Les principaux producteurs de la pomme de terre au monde en 2016 sont présentés dans la figure 2.



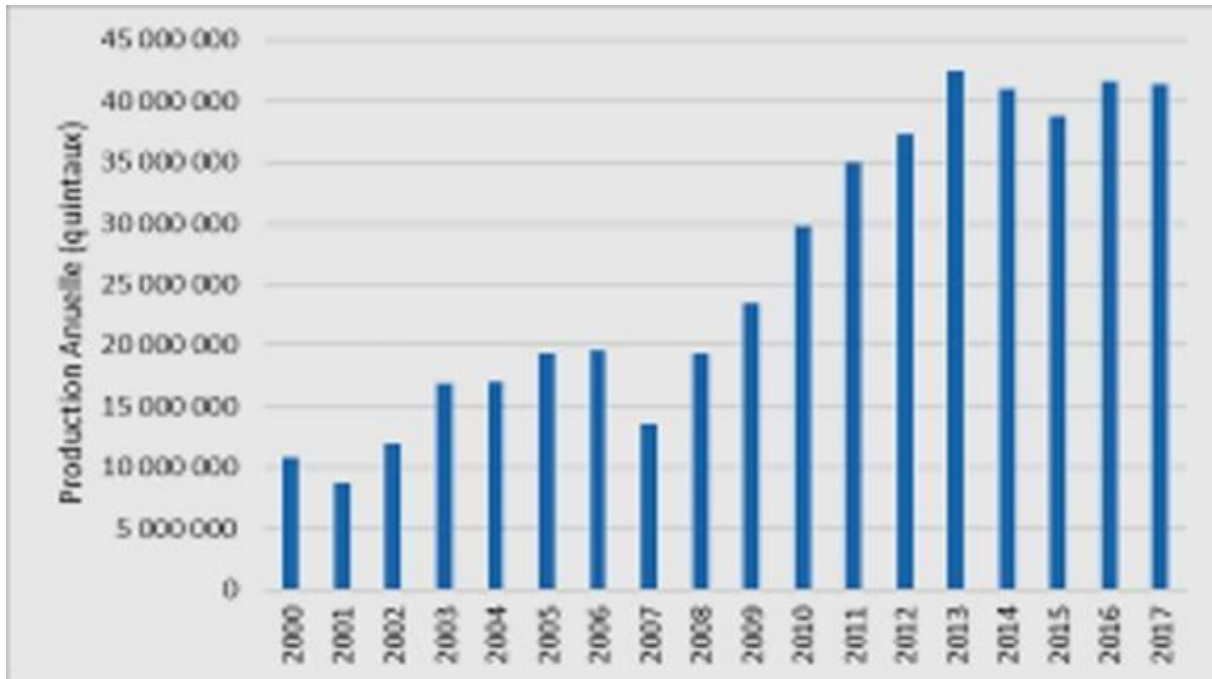
**Figure 2** Principaux producteurs de la pomme de terre au monde en 2016 (FAO stat, 2018).

Durant l'année 2017, la production mondiale est de 388 millions de tonnes sur une superficie de 193 millions d'hectares. Ainsi, l'Asie est le plus grand producteur de pomme de terre représentant plus de 48.1% de la production mondiale, l'Europe occupe une seconde place avec 32,9%, puis l'Amérique avec 11.6%. La production de l'Afrique reste la plus faible (6,8%) (FAO Stat, 2019).

#### 2.1.4- Importance de la pomme de terre en Algérie

Après l'indépendance, la pomme de terre est devenue un produit important pour la consommation locale, elle occupe une place importante dans le régime alimentaire. La demande en cette culture s'est alors accrue ; elle représente la première culture maraîchère du point de vue superficie et production (Chehat, 2019).

Selon diverses sources, la consommation de pomme de terre qui était évaluée à 21,7 kg en 1966,1967 (FAO), a augmenté aux alentours de 34 kg/habitant/an en 1979,1980 (enquête ONS), et se situerait à 113 kg/ habitant/an en 2015, faisant ainsi de ce produit agricole un élément structurant de la ration alimentaire de l'algérien (Bessaoud et Lefki, 2018). Selon la figure 3, la production a quadruplé entre les années 2000 et 2017 passant approximativement de 10 millions de quintaux à plus de 40 millions de quintaux (Bessaoud et Lefki, 2018).



**Figure 3** Production de la pomme de terre en Algérie (Bessaoud et Lefki, 2018).

### 2.1.5-Description botanique

La pomme de terre est constituée de deux parties distinctes (figure 4) :

#### 2.1.5.1- Partie aérienne

Elle contient :

- **La tige** : Les tiges aériennes sont généralement au nombre de deux à dix, parfois davantage avec un port plus ou moins dressé et une section irrégulière (Soltner, 2005).
- **Les feuilles** : Les feuilles sont alternes, disposées sur la tige suivant une phyllotaxie spirale avec une spirale génératrice tournant le plus souvent dans le sens sénestre (Rousselle *et al.*, 1996).
- **Les fleurs** : Elles se produisent à l'extrémité des tiges aérienne, de couleur blanchâtre ou plus foncés. Elles sont autogames et ne contiennent pas de nectar, et donc peu visitées par les insectes, la fécondation croisée est presque inexistante dans la nature (ROUSSELLE *et al.*, 1996).

### 2.1.5.2- Partie souterraine

- **Les racines** : sont adventives, fasciculées, qui naissent au niveau des nœuds enterrés des tiges feuilles au niveau des nœuds des stolons (Rousselle *et al.*, 1996).
- **Tiges souterraines ou stolon** : sont des tiges latérales qui se développent horizontalement à partir des bourgeons de la partie souterraine des tiges (Sawyer, 1987).
- **Les tubercules** : sont des tiges modifiées et ils représentent l'organe principal de réserve de la plante de pomme de terre (Rousselle *et al.*, 1996).

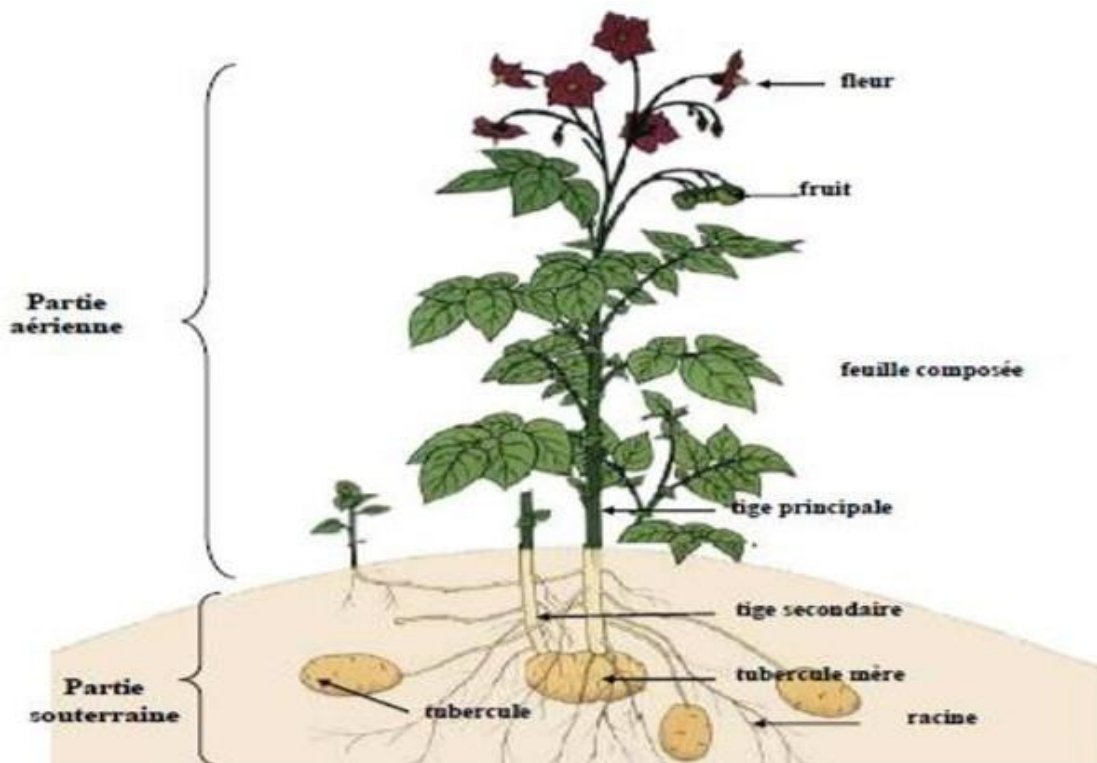


Figure 4 Plante de pomme de terre (FAO, 2015).

### 2.1.6- Caractéristiques de la pomme de terre

#### 2.1.6.1- Caractéristiques du tubercule

Quatre principaux critères permettent de caractériser le tubercule (Rousselle *et al.*, 1996).

Le premier critère c'est la forme des tubercules qui sont classés en quatre grands types : les claviformes, les oblongues, les arrondis et les cylindriques allongés.

Ensuite, l'enfoncement des yeux dont la plupart des variétés ont des yeux superficiels, peu d'entre elles ont des yeux demis enfoncés.

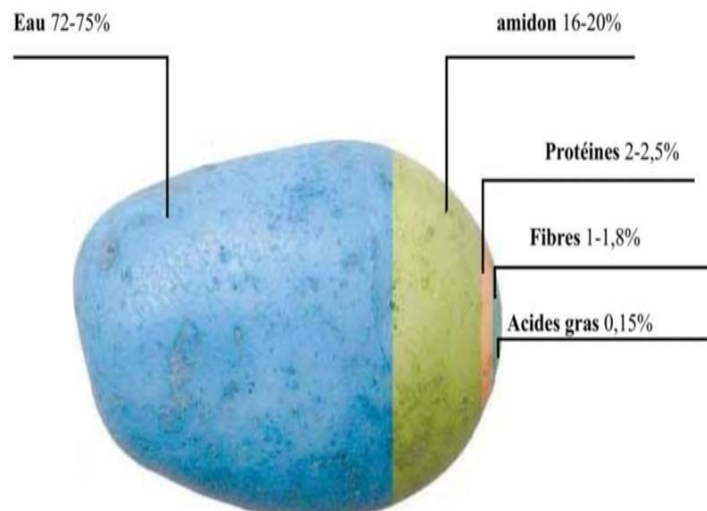


Puis, la couleur et la texture de la peau dont la coloration est due à la présence d'un ou plusieurs pigments dans les cellules du péri derme qui donnent à la peau une teinte jaune, rose pâle, bleu-violacée et violet foncé.

Le dernier critère c'est la couleur de la chair qui présente toute une gamme de teintes allant du blanc au jaune.

### **2.1.6.2-Composition biochimique du tubercule**

La Pomme de terre a une valeur nutritionnelle très satisfaisante. En effet, elle apporte des vitamines, des oligoéléments et autres minéraux qui sont nécessaires à une alimentation saine et équilibrée. Elle représente une bonne source d'énergie grâce à l'amidon renfermé dans son tubercule, elle a donc une haute teneur en glucides. En effet, dans environ 20% de sa matière sèche, on trouve 60 à 80% d'amidon. Elle contient environ 90 kcals pour 100 g (figure 5) (Oswaldo, 2010).



**Figure 5** la composition biochimique d'un Tubercule de pomme de terre (*Solanum tuberosum L.*).

Les valeurs sont exprimées en pourcentage de la matière fraîche totale (FAO, 2008).

### **2.1.7-Physiologie et multiplication de la pomme de terre**

Elle peut se reproduire en deux manières :

#### **a-Reproduction sexuée**

Le fruit est une baie sphérique ou ovoïde de 1 à 3 centimètres de diamètre, il contient généralement plusieurs dizaines de graines. La pomme de terre est très peu reproduite par graines dans la pratique agricole, cependant la graine est l'outil de création variétale (Rousselle *et al.*, 1996).

#### **b-Reproduction végétatif**

Cette dernière se déroule en trois étapes :

La dormance qui est une période de repos qui existe également chez les graines. La durée de la dormance est en fonction de la variété et les conditions d'entreposage, et surtout de la température, Elle peut être très courte ou très longue (Polese, 2006).

Ensuite, la croissance du germe s'effectue s'il n'y a pas de dormance induite par les conditions de milieu. C'est généralement le bourgeon principal de l'œil situé au sommet de la couronne.

Enfin, La tubérisation correspond à l'élongation des stolons, la différenciation à l'extrémité de ceux-ci des tubercules fils et leur augmentation de taille (Mazoyer, 2002).

## **2.2-Les agents phytopathogènes**

### **2.2.1-Les maladies fongiques**

#### **2.2.1.1- L'altérioriose (*Alternaria alternata*)**

##### **➤ Généralités**

La maladie de l'altérioriose se trouve partout pendant la culture de pomme de terre où les pertes peuvent être importantes lorsque l'infection foliaire est grave avant ou peu après la floraison. Cette maladie touche aussi la tomate, le poivron, l'aubergine et plusieurs adventices de la famille des solanacées. (Richard et Boivin, 1994).

##### **➤ Symptômes**

Cette infection provoque sur les feuilles des lésions qui ressemblent souvent à des taches marronnes sous forme d'anneaux concentriques (figure 6). Ces taches apparaissent habituellement quelques semaines après la levée de la plante et, dans un premier temps, sur les feuilles du bas, sous la forme de petites taches noires ou brunes qui s'agglomèrent par la suite (Kerr, 2014).



**Figure 6** Les symptômes de l'Alternariose sur la pomme de terre (Kerr, 2014).

### **2.2.1.2-La pourriture aqueuse (*Pythium spp*)**

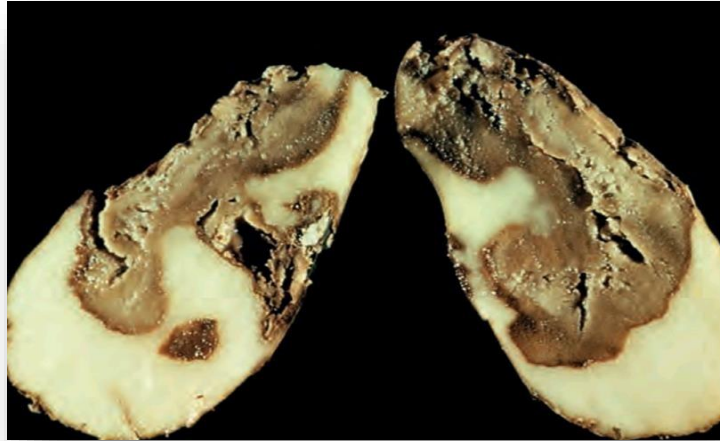
#### **➤ Généralités**

On trouve la pourriture aqueuse dans toutes les régions où on cultive la pomme de terre. Elle cause des problèmes chez les tubercules récoltés avant maturité lorsque les sols sont chauds et humides. Cette maladie provoque une pourriture des semences, une fonte des semis et une pourriture des racines chez plusieurs cultures légumières. (Richard et Boivin, 1994).

#### **➤ Symptômes**

L'infection apparaît sous forme de grandes lésions brun pâle à brun foncé à la surface du tubercule, notamment sur le talon (figure 7) (Richard et Boivin, 1994).

La pourriture se développe dans la chair du tubercule, une ligne foncée séparant nettement le tissu extérieur au sein du tissu malade spongieux, brun clair. Le tissu pourri dégage initialement une odeur d'alcool, puis, lorsque la pourriture s'aggrave, une odeur de poisson. (Kerr, 2014).



**Figure 7** Symptômes causés par *Pythium spp* (Kerr, 2014).

### **2.2.1.3- Le mildiou (*Phytophthora infestans*)**

#### **➤ Généralités**

Le mildiou est l'une des maladies fongiques les plus graves de la pomme de terre. Il est très répandu dans la majorité des zones de culture. Peu après qu'elle soit devenue une culture vivrière importante en Europe, la maladie a atteint des proportions désastreuses. (Jan et Henfling, 1979).

#### **➤ Symptômes**

On observe d'abord sur les feuilles et les tiges des plantes attaquées des zones vert pâle, aqueuses, à contour irrégulier, qui s'étendent lorsque les conditions sont favorables (figure 8). Les zones infectées en viennent à former des lésions nécrotiques brunes ou noir violet entourées d'un cerne vert pâle à jaunâtre (Platt, 2008).

Les racines et les stolons présentent rarement des symptômes, mais les tubercules infectés présentent des zones légèrement déprimées de grandeur variable et de forme irrégulière, où la peau est brunviolet et coriace (Platt, 2008).



**Figure 8** Symptômes causés par *Phytophthora infestans* (Kerr, 2014).

#### **2.2.1.4- La fusariose (*Fusarium spp*)**

##### **➤ Généralités**

La fusariose ou la pourriture sèche est un problème fréquent chez les pommes de terre de semence de classe inférieure. On trouve cette maladie partout où l'on cultive la pomme de terre. Les champignons responsables de la pourriture sèche attaquent aussi de nombreuses autres cultures telles que les céréales, les graminées, les fruits, les plantes ornementales et certains légumes (Richard et Boivin, 1994).

##### **➤ Symptômes**

Les tissus infectés sont brun pâle à noirs et très secs. Les tubercules se couvrent de grands anneaux concentriques et déprimés, qui s'affaissent sous une légère pression. Les tubercules complètement pourris se plissent et se momifient (figure 9). Les cavités situées sous les zones pourries sont habituellement tapissées d'un mycélium blanc, rosé ou bleuté typique des champignons du genre *Fusarium*. Les tubercules peuvent aussi être mous et humides s'ils sont aussi infectés par des agents de pourriture molle (Richard et Boivin, 1994).



**Figure 9** Symptômes causés par *Fusarium solani* (Kerr, 2014).

#### **2.2.1.5- La pourriture rose (*Phytophthora erythroseptica*)**

##### **➤ Généralités**

La pourriture rose, causée par l'oomycète *Phytophthora erythroseptica*, (Ho et Jong, 1989) peut entraîner des pertes post récoltes énormes. Le pathogène est présent dans le sol de toutes les régions productrices de pomme de terre (Evans et Howard, 1994 ; Tooley *et al.*, 1998 ; Platt, R., 2008).

##### **➤ Symptômes**

Les parties aériennes de la plante infectée ne présentent aucun symptôme, mais des lésions allongées brun clair apparaissent sur les racines et les stolons. *Le P. erythroseptica* infecte les tubercules par la voie des stolons, des yeux, des lenticelles et des blessures. L'infection provoque l'apparition de lésions brun terne de taille variable et de forme irrégulière à la surface des tubercules ainsi que de cernes foncés autour des yeux et des lenticelles (figure 10). La zone infectée est entourée d'une ligne foncée apparaissant à la surface du tubercule. La chair du tubercule devient molle, spongieuse, aqueuse, de couleur crème ou brun clair, souvent à partir du talon. (Platt, R., 2008).



**Figure 10** Symptômes de la pourriture rose (Kerr, 2014).

#### 2.2.1.6- La gale argentée (*Helminthosporium solani*)

##### ➤ Généralités

La pomme de terre est l'unique culture maraîchère connue pouvant être infectée par *H. solani* (Kamara et Huguelet, 1972). Le champignon peut toutefois infecter plusieurs espèces non maraîchères appartenant aux Solanacées à tubercules telles que *Solanum tuberosum*, *S. chacoense* et *S. demissum* (Rodriguez et coll., 1995).

##### ➤ Symptômes

La gale argentée de la pomme de terre est une maladie esthétique qui se caractérise par des taches circulaires argentées sur la pomme de terre à peau blanche et bronzées sur la pomme de terre à peau rouge (figure 11). Sur ces taches, on peut retrouver de fines ponctuations noires qui sont des stromas desquels émergent les conidiophores (Heiny et McIntyre, 1983).

Ces symptômes peuvent parfois être difficiles à détecter visuellement sur des pommes de terre à peau blanche, mais sont apparents sur les pommes de terre à peau rouge (Zitter et Loria, 2007).





**Figure 11** Symptômes causés par *Helminthosporium solani* (Kerr, 2014).

## **2.2.2- Les maladies bactériennes**

### **2.2.2.1- La jambe noire (*Pectobacterium spp*)**

#### **➤ Généralités**

La jambe noire se trouve dans toutes les régions où l'on cultive la pomme de terre ; elle est souvent accompagnée de pourriture molle. Cette maladie peut causer de lourdes pertes dans les cultures de pommes de terre de semence et de consommation. La gravité de cette maladie dépend des techniques de préparation des semences et la quantité d'inoculum présent sur les semences, de l'humidité et de la température du sol au moment de la plantation, des conditions de croissance, du cultivar utilisé et des sources extérieures de bactéries (Richard et Boivin, 1994).

#### **➤ Symptômes**

Les plantes sont rabougries et ont une apparence « dure ». Les feuilles sont rigides et érigées, s'enroulant souvent vers l'intérieur au sommet. Une pourriture visqueuse noire apparaît généralement à la base de la tige lorsque la maladie progresse (figures 12 et 13). Les tiges atteintes sont facilement arrachées (Kerr, 2014).





Figure 12 et 13 Symptômes causés par la jambe noire (Kerr, 2014).

### 2.2.2.2-Gale commune (*Streptomyces scabiei*)

#### ➤ Généralités

La gale commune est causée par la bactérie *Streptomyces scabiei* appartenant au groupe des Actinomycètes. Ce sont des bactéries hétérotrophes qui forment une structure filamenteuse et vivante dans le sol. La gale commune est moins fréquente que la gale poudreuse, Il est peut-être difficile de différencier les symptômes de la gale commune et de la gale poudreuse. Le principal indice réside dans le fait que les lésions de la gale commune sont plus grandes, de diamètres variables et moins nombreuses que les pustules de la gale poudreuse (Dallaire, 2008).

#### ➤ Symptômes

Il n'y a aucun symptôme au niveau des parties aériennes de la plante. La bactérie *Streptomyces* s'attaque généralement aux tubercules des pommes de terre et quelques rares fois aux stolons, aux racines et aux tiges souterraines. Après la récolte, les symptômes n'évoluent pas lors de l'entreposage. La bactérie cause des lésions sur l'épiderme du tubercule. Les lésions ressemblent à des croûtes subéreuses de marron clair à brunes, de formes irrégulières pouvant atteindre entre 5 à 10 mm de diamètre et de différentes profondeurs dans la chair (figure 14). Elles sont réparties au hasard à la surface de l'épiderme (Dallaire, 2008).



**Figure 14** Symptômes causés par *Streptomyces scabiei* (Kerr, 2014).

### 2.2.2.3- Flétrissement bactérien (*Corynebacterium sepedonicum*)

#### ➤ Généralités

Le flétrissement bactérien est une maladie très grave de la pomme de terre. Elle cause des dommages très sérieux et elle est extrêmement infectieuse. Elle a été décrite pour la première fois en Allemagne en 1906 et signalée pour la première fois en Amérique du Nord en 1931. La bactérie du flétrissement bactérien attaque seulement la pomme de terre, mais en laboratoire, elle infecte la tomate, l'aubergine et de nombreuses autres espèces de *Solanum* (Richard et Boivin, 1994).

#### ➤ Symptômes

Les bords des folioles flétries sont légèrement enroulés et des plages vert pâle à jaune pâle apparaissent entre les nervures des feuilles. À mesure que le flétrissement s'accroît, les feuilles infectées développent des nécroses et les symptômes progressent vers le haut jusqu'à ce que la plante en entier flétrisse et meure (figure 15). La pourriture des tissus de l'anneau vasculaire du tubercule est un symptôme caractéristique de la présence du flétrissement bactérien, Cette pourriture débute habituellement après l'apparition des symptômes foliaires, mais ne se développe pas toujours dans les tubercules des plantes infectées. Le péri derme des tubercules gravement infectés est fendillé et tuméfié. Les tubercules prennent une coloration brun rougeâtre, près des yeux, et s'affaissent en un mélange semi-liquide lorsqu'on les manipule (Richard et Boivin, 1994).



**Figure 15** Symptômes de flétrissement bactérien (Kerr, 2014).

### **2.2.3- Les maladies virales**

#### **2.2.3.1- Le Calicot (Virus de la mosaïque de la luzerne)**

##### ➤ **Généralités**

Le calicot est une maladie de faible importance sur la pomme de terre. Elle est présente dans la plupart des régions productrices de pommes de terre au Canada. Le virus a de nombreux hôtes dont les légumineuses, les solanacées ainsi que 10 autres familles de plantes (Richard et Boivin, 1994).

##### ➤ **Symptômes**

Le virus de la mosaïque de la luzerne cause une marbrure jaune pâle à jaune vif ou une tacheture des folioles de la pomme de terre, et fréquemment une légère nécrose des folioles, des tiges et des tubercules (Richard et Boivin, 1994).

### **2.2.3.2-Enroulement de la pomme de terre (Virus de l'enroulement de la pomme de terre)**

#### ➤ **Généralités**

L'enroulement de la pomme de terre se trouve partout dans le monde et cause d'importantes pertes de rendement et de qualité. On doit habituellement rejeter les pommes de terre de transformation qui ont été cultivées dans les champs gravement touchés par ce dernier, plusieurs espèces de plantes cultivées et adventices, surtout de la famille de la pomme de terre (Solanacées), sont des hôtes du virus (Richard et Boivin, 1994).

#### ➤ **Symptômes**

Les plantes issues de tubercules infectés par l'enroulement développent des symptômes caractéristiques, les folioles au bas de la plante sont enroulées, raides, sèches, parcheminées, et peuvent cliqueter lorsqu'on les secoue. Les symptômes sont moins prononcés chez les feuilles de la partie supérieure qui semblent pâles ou chlorotiques. L'intensité des symptômes dépend de la souche de virus, du cultivar de pomme de terre et des conditions de croissance (Richard et Boivin, 1994).

### **2.2.3.3-Virus du Rattle**

#### ➤ **Généralités**

Le virus du Rattle est transmis par les nématodes libres *Trichodorus* et *Paratrichodorus* (pas les nématodes à kystes), qui sont très nombreux dans les terres sableuses légères et se déplacent dans les capillarités du sol. La gamme d'hôtes du virus du Rattle est très large, rendant quasi inefficaces les mesures de rotation entre cultures de pommes de terre. (Kerr, 2014).

#### ➤ **Symptômes**

Les symptômes sur les feuilles apparaissent sous forme d'un pincement caractéristique vers l'extrémité de la foliole, avec des bords de couleur rouge-mauve ou jaune.

Les tubercules peuvent développer des nécroses, taches et arcs liégeux de couleur brune dans la chair du tubercule, parfois visibles sur la surface de la peau (Kerr, 2014).

## **2.3- Lutte contre les agents phytopathogènes**

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

### **2.3.1- Lutte physique**

Différents moyens physiques et mécaniques peuvent être utilisés pour éliminer ou limiter le développement de certains ennemis. Ils ne suffisent pas à protéger totalement les cultures. C'est pourquoi ils sont généralement associés à d'autres moyens de lutte. Certains facteurs physiques, tels que la température (basse et élevée), l'air sec, la lumière et la radiation, peuvent être utilisés pour contrôler les maladies des plantes (Nasraui, 2006).

Plusieurs méthodes préventives peuvent être utilisées notamment la destruction par le feu des débris végétaux infectés ou leur enfouissement dans le sol.

La désinfection du sol, soit par la solarisation ou traitement à la vapeur, semble la seule méthode de contrôle approuvée. La solarisation consiste à bien mouiller le sol et à le recouvrir d'une toile en plastique pendant les périodes les plus chaudes de l'été (Mohamed, 2010), la température sous la toile devient rapidement très élevée, ce qui détruit les organismes responsables des maladies des plantes (Melero-Vara et *al.*, 2013).

### **2.3.2- Lutte génétique**

La lutte génétique 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).

### **2.3.3- Méthodes culturales**

Plusieurs techniques culturales réduisent le risque des maladies avant ou pendant l'implantation de la culture (Maufras, 2001).

On citera à titre d'exemple d'éviter les semis précoces et trop denses et d'Assurer un désherbage permettant d'éliminer les mauvaises herbes qui entretiennent un microclimat

humide qui pourrait être un foyer de germes pathogènes. Aussi, il faut Eliminer les repousses des plantes et respecter les assolements et les rotations (Maufras, 2001).

### **2.3.4- 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 (Lepoivre, 2003). La plupart des molécules antibactériennes utilisables en agriculture agissent directement sur les agents pathogènes, il est possible de protéger les plantes de manière indirecte à l'aide de composés qui, soit inactivent des médiateurs émis par les parasites et indispensables à leur pathogénicité (Enzymes, toxines), soit stimulent les réactions de défense des plantes (inducteurs) (Leroux et Gardan, 2003).

### **2.3.5- Lutte biologique**

La lutte biologique est considérée comme une voie alternative à l'utilisation des produits chimiques qui constituent un danger pour l'environnement et pour l'homme. L'utilisation de plusieurs modes d'action par un seul agent antagoniste et sa capacité d'adaptation à la rhizosphère contribuent à ce que la lutte biologique devienne plus durable que les produits chimiques (Benbrook*et al.*, 1996).

Dans le sens écologique strict, l'application de la lutte biologique peut être considérée comme une stratégie pour restaurer la biodiversité dans les agros écosystèmes par l'addition des antagonistes naturels (parasite ou prédateur) (Si Amar., 2017).

## **2.4- Agent antagoniste**

Le contrôle biologique avec les microorganismes bénéfiques permet d'augmenter le rendement en supprimant directement l'inoculum pathogène et/ou en induisant la résistance des plantes. Plusieurs travaux ont été entrepris pour la sélection des antagonistes aux microorganismes phytopathogènes afin de les utiliser comme agents potentiels de lutte biologique (Si Amar, 2017).

### 2.4.1- Genre *Bacillus spp*

Le genre *Bacillus* est très hétérogène, comprend au moins 36 espèces. Ce sont en générale des bacilles unicellulaire à GRAM +, oxydase négatif, catalase positif, mobiles sauf *Bacillus anthracis*. Elles sont aérobies strictes ou anaérobies, facultatifs suivant les espèces et tirent leur énergie de la respiration ou la fermentation. Lorsque les conditions deviennent défavorables, les *Bacillus* sporulent et donnent des spores souvent très résistantes dans le milieu extérieur. Elles peuvent être conservées longtemps dans un endroit frais et sec. Les *Bacillus* sont chimio hétérotrophes, saprophyte et ubiquitaires, il existe des espèces thermophiles et acidophiles (Madigan et Martink, 2007).

Toutes les espèces du groupe *Bacillus subtilis* sont non pathogènes à l'homme, ce qui explique leur large utilisation dans le domaine de la recherche ainsi qu'en agriculture organique. Il est important de signaler que le genre *Bacillus* possède la possibilité de se sporuler dans des conditions défavorables ce qui facilite sa production industrielle et sa formulation en un produit stable (Harwood et Wipat, 1996; Lolloo *et al.*, 2010).

Selon la classification de Bergey, le genre *Bacillus* est classé comme suit (Tableau 2):

**Tableau 2** Classification du genre *Bacillus*.

Régne	Bacteria
Phylum	Firmicutes
Classe	Bacilli
Ordre	Bacillales
Famille	Bacillaceae
Genre	<i>Bacillus</i>

### 2.5- Rhizosphère

Le concept de rhizosphère a été développé par le microbiologiste visionnaire Hiltner qui perçut dès 1904 (Khakipouret *al.*, 2008). « rhizo » vient du grec « rhiza » signifiant racine, « sphère » vient du latin « sfaire » signifiant balle, ballon ou globe. La sphère définit le champ d'influence du système racinaire. La rhizosphère est le volume de terre directement soumis à l'action des racines. La richesse de cette zone la rend favorable à la colonisation par des microorganismes dont leur activité, modifie sa composition et

son activité chimique (Benhacene *et al.*, 2016). Elle correspond aux surfaces d'échanges entre les racines et les minéraux de la terre ainsi qu'entre les racines et les microorganismes, c'est une zone où les relations entre plantes et microorganismes sont particulièrement actifs. Elle constitue une continuité entre le milieu biologique et le milieu physique (Benhacene *et al.*, 2016).

### **2.5.1- Interactions entre les microorganismes de la rhizosphère**

Dans la rhizosphère on distingue trois zones : l'endorhizosphère, le rhizoplan et l'ectorhizosphère). Les microorganismes qui se trouvent dans cette zone, nous appelons les « Rhizobactéries ». Dans cet environnement, il y a des interactions entre les racines des plantes, les microbes, et le sol (Ghitri, 2018).

#### **2.5.1.1- Commensalisme**

Définit une interaction bénéfique pour l'un des partenaires, permet à un partenaire de tirer profit sans dommage pour le second (Quénéa, 2004).

#### **2.5.1.2- Parasitisme**

Une interaction directe entre deux microorganismes où les tissus vivants de l'un constituent une base nutritive pour l'autre (Helluy et Holmes, 2005). Il implique l'invasion des cellules de l'agent pathogène par le microorganisme antagoniste (Corbaz, 1990).

#### **2.5.1.3- 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).



*Matériel et  
méthodes*

### **3- Matériel et méthodes**

En Algérie, les maladies phytopathogènes de cultures sont principalement traitées à l'aide de fongicides chimiques, connus pour leurs effets nocifs et toxiques sur l'environnement et la santé humaine. De ce fait, la recherche de microorganismes producteurs de substances antimicrobiens s'avère nécessaire pour lutter contre ce genre de maladies, et ce, en accordant un intérêt à l'étude de microorganismes de la rhizosphère qui peuvent former un réservoir de substances bioactives, en particulier, celles qui développent une activité antifongique. Pour ce faire, le présent travail porte sur l'isolement de microorganismes à partir du sol de la rhizosphère et la sélection d'isolats à effet antagoniste sur les agents phytopathogènes de la pomme de terre.

#### **3.1- Isolement des agents phytopathogènes**

L'isolement des agents phytopathogènes a été effectué à partir de feuilles, tiges et fruits de la pomme de terre présentant des symptômes de maladies. En effet, les échantillons ont été prélevés à partir de la région d'El Harrouche de Skikda (figure 16).



**Figure 16** Sites d'échantillonnage de l'agent phytopathogène à partir de la région d'El Harrouche, (Skikda).

### 3.1.1- Echantillonnage

Dans ce travail, l'échantillonnage a été effectué le mois de Mars 2022 à partir de feuilles, de tiges et de fruits de la pomme de terre qui montraient des symptômes de maladies phytopathogènes en l'occurrence : petites taches noires dispersées sur la face supérieure de la feuille ; grosses taches posséderont une structure plus ou moins circulaire, représentant des cercles concentriques (figure17) ; ainsi des taches brunes et des brûlures (figure 17).



**Figure 17** Symptômes de maladies phytopathogènes sur des feuilles et des tiges de la pomme de terre.

Les échantillons ont été transportés dans des sachets stériles en plastique, étiquetés puis ramenés au laboratoire, en utilisant une glacière. Ensuite les travaux ont été effectués dans des conditions aseptiques.

### **3.1.2- Isolement**

Les échantillons infectés de la pomme terre ont été coupés en petits morceaux, qui ont été désinfectés en surface à l'aide d'une solution d'hypochlorite de sodium à 1% pendant 3 minutes, rincés 3 fois dans de l'eau distillée stérile, séchés avec du papier filtre stérile. Les fragments désinfectés ont été déposés sur milieu Potatos dextrose Agar (PDA) (Annexe 1), puis les boîtes de pétri ont été incubées à 30°C pendant 7 jours (Abbasher, 1998).

### **3.1.3- Purification**

Les isolats obtenus ont été purifiés à l'aide d'une série de sous-cultures, de sorte que chaque colonie de moisissures qui a émergé a été sous-cultivée au centre et individuellement dans une autre boîte de Pétri jusqu'à l'obtention d'une souche pure (Botton *et al.*, 1990). Le milieu utilisé pour la purification était le même que celui utilisé pour l'isolement ; PDA. Tous les isolats sous-cultivés ont été incubés à 30°C pendant 7 jours.

### **3.1.4- Identification de l'agent phytopathogène**

L'identification des isolats fongiques obtenus se base essentiellement sur l'analyse de caractères macroscopiques et microscopiques.

#### **➤ Observation macroscopique**

L'observation macroscopique a été effectuée à l'œil nu, par l'observation des caractéristiques morphologiques en l'occurrence ; aspect et couleur du mycélium fongique, vitesse de croissance, texture et couleur du thalle, couleur du revers de la culture et présence d'un pigment diffusible (Botton *et al.*, 1990).

#### **➤ Observation microscopique**

L'identification des isolats fongiques a permis de détecter plusieurs caractères tels que la structure du mycélium (cloisonnement), le type de conidiospores, le type de formation des conidies et leurs formes, la couleur et ornementation ... etc. L'observation microscopique a été réalisée à partir d'une culture jeune par un prélèvement d'un petit fragment mycélien, à l'aide d'une anse de platine stérile, ce fragment est ensuite transféré sur une lame et dissocié dans une goutte d'eau distillée, ensuite, recouverte par une lamelle (déposer délicatement la lamelle

pour éviter la formation de bulles d'air). L'observation a été réalisée au microscope optique (Optech, optical technology) à l'objectif (X40) (Annexe 2) (Harrigan et Mccance, 1976).

### **3.1.5- Test de phytopathogénicité**

Des plantules saines de tomate âgées de cinq semaines ont été plantées dans des pots en plastique contenant le terreau. L'arrosage de pots a été effectué chaque deux jours avec de l'eau brute jusqu'au stade prescrit pour l'inoculation. En effet, la préparation de l'inoculum de chaque moisissure âgée de 10 jours a été effectuée comme suit : Une quantité de 20 mL d'eau distillée stérile a été versée sur chaque boîte de moisissure obtenue (Hariprasard et Niranjana, 2008). Puis, à l'aide d'une spatule métallique la surface de chaque culture chargée de conidies a été raclée stérilement. Ensuite, la solution obtenue a été agitée vigoureusement pendant une minute à l'aide d'un vortex et ajustée jusqu'à l'obtention d'une concentration de  $5 \times 10^7$  conidie/mL et pulvérisée sur les parties aériennes des plantes, en utilisant un pulvérisateur (Bahous *et al.*, 2008). Cependant, les pots ont été couverts par des sacs en polyéthylène. Au bout de 48 heures, les sacs ont été retirés et les pots ont été, ensuite, placés dans la serre. Après un séjour de 20 jours, la maladie a été constatée (Kumara et Srivastava, 2013)

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

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

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

Pour confirmer que les symptômes observés après inoculation des agents phytopathogènes s'agissent effectivement de ceux provoqués par ces agents, un ré-isolement a été réalisé sur le milieu PDA, puis comparé avec la culture initiale.



### 3.2- Isolement de l'agent antagoniste

L'agent antagoniste de cette étude a été isolé à partir de la région d'Ain Bouziane (figure18, figure19). En fait, l'échantillonnage a été effectué à partir du sol de la zone de la rhizosphère des plantules saines de la pomme de terre.



Figure 18 Site d'échantillonnage à partir de la région de Ain Bouziane de Skikda.

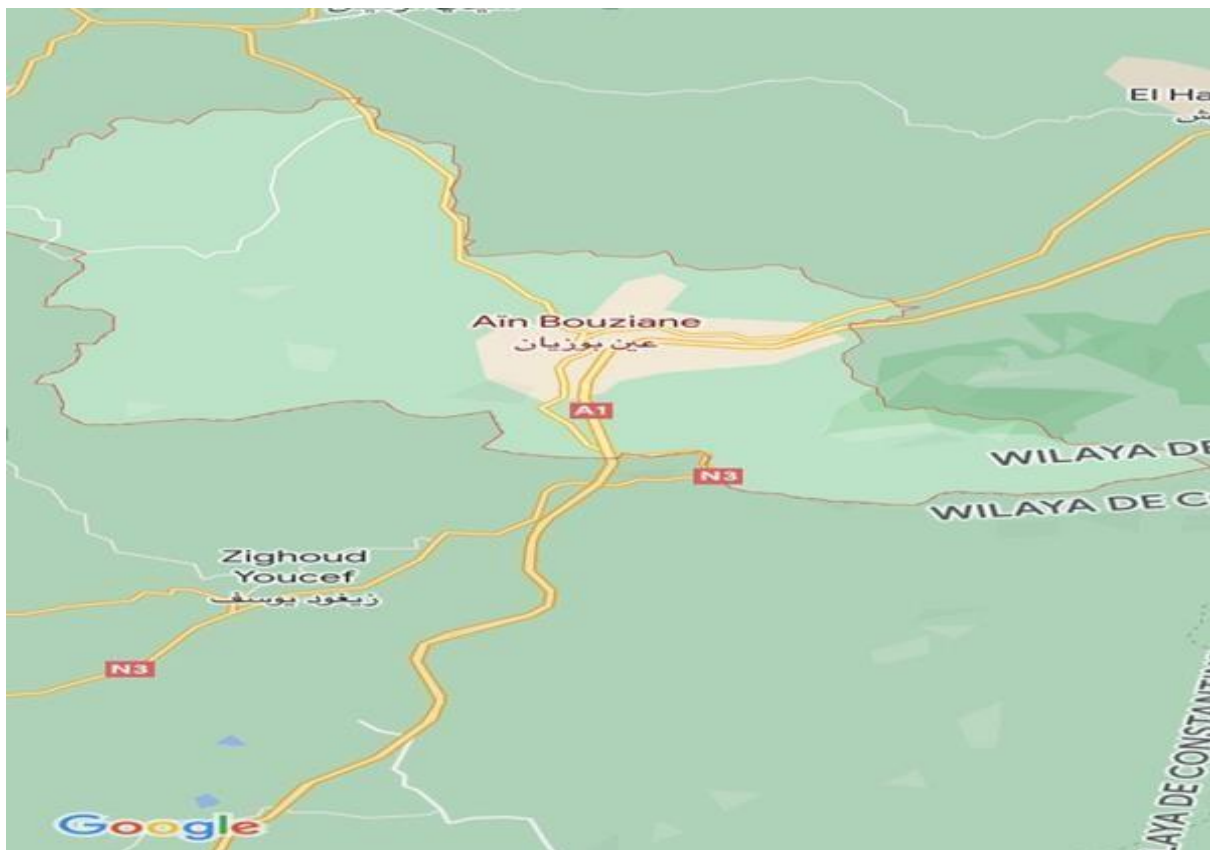


Figure 19 Localisation géographique de la région de Ain Bouziane de skikda.

### **3.2.1-Echantillonnage**

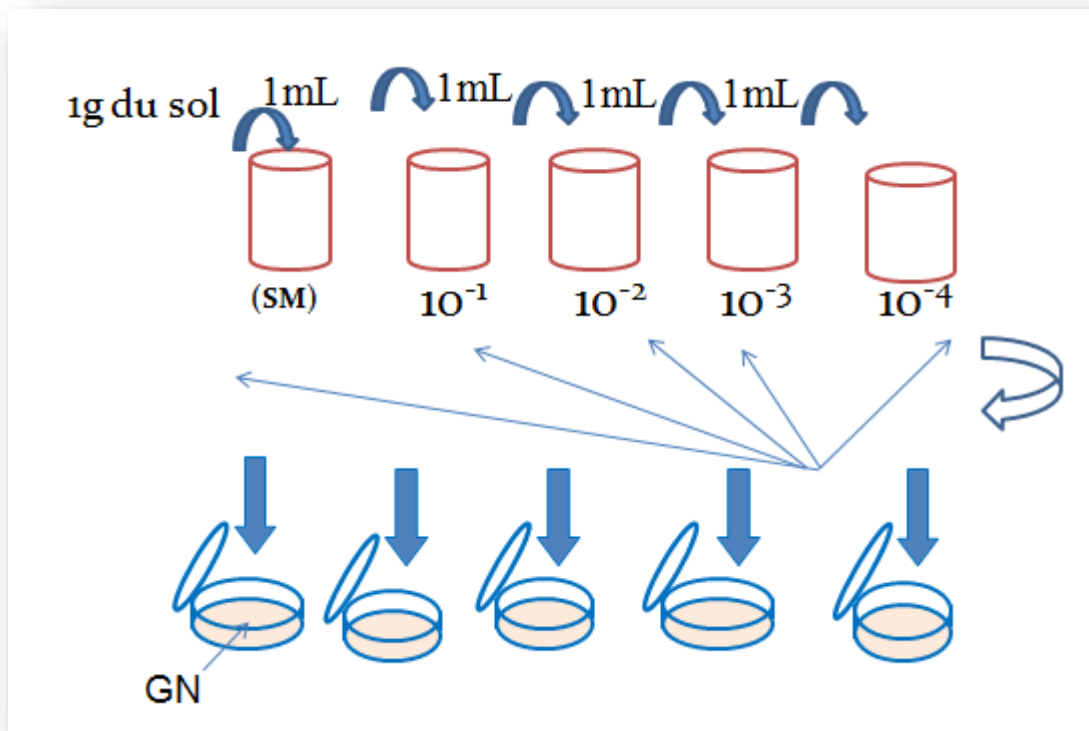
L'échantillonnage de l'agent antagoniste a été effectué le mois de Mars 2022 à partir du champ de la pomme de terre de la région d'Ain Bouziane de Skikda. En effet, les prélèvements du sol ont été réalisés à l'aide d'une cuillère stérile, la première couche de 3 cm (couche supérieure) est retirée (Saadoune et Momani, 1997) et une couche de 20 cm (couche inférieure) a été collectée dans des flacons stériles (figure 20). Ces derniers ont été transportés rapidement au laboratoire.



**Figure 20** Sols et site d'échantillonnage : (A, B) Zone de la rhizosphère d'une plantule saine de la pomme de terre située à Ain Bouziane de Skikda.

### **3.2.2- Isolement**

L'isolement a été basé sur la méthode de dilution. En effet, la préparation des dilutions consistait d'abord à préparer une solution mère. Suspender un gramme du sol dans 9 ml d'eau physiologique stérile, puis homogénéiser au vortex pendant 10 min. Cette dilution représente la solution mère à partir de laquelle d'autres dilutions à  $10^{-4}$  (dilution décimale) ont été préparées (Botton *et al.*, 1990) (figure 22).



**Figure 21** Méthode de dilution à partir du sol de la zone de la rhizosphère de plantule saine de la pomme de terre.

A partir des dilutions obtenues, 1mL de chaque dilution a été ensemencé dans des boîtes de Pétri contenant le milieu GN (Annexe1) et le milieu PDA successivement. L'incubation a été réalisée à 30°C, et la lecture des boîtes a été effectuée après le deuxième, le troisième, et le cinquième jour d'incubation.

### 3.2.3-Purification

Après l'étape d'isolement, des sous-cultures successives ont été réalisées jusqu'à l'obtention de micro-organismes purs. Le milieu utilisé pour la purification était le même que celui utilisé pour l'isolement (GN). L'incubation a été effectuée à 30°C pendant 48 heures.

### 3.3- Sélection des agents antagonistes

La capacité de bactéries isolées à partir du sol de la zone de la rhizosphère de la pomme de terre à inhiber le développement de moisissures phytopathogènes de la pomme de terre a été étudié, en se basant sur la méthode de confrontation par contact direct sur gélose sabouraud.



### **3.3.1- Confrontation par contact direct sur milieu de culture**

La technique consiste à placer, dans la même boîte de Pétri contenant de milieu sabouraud, deux disques de gélose (0,4 cm de diamètre), l'une portant l'antagoniste à tester et l'autre l'agent phytopathogène. Les disques ont été implantés simultanément, espacés de 3 cm le long de l'axe de la boîte. Des notations concernant l'inhibition de la croissance diamétrale des colonies de l'agent phytopathogène ont été effectuées. Dans les cultures témoins, le disque de l'antagoniste et celui de l'agent phytopathogène ont été placés au centre de boîte de Pétri contenant le milieu sabouraud, l'incubation a été réalisée à 30 °C pendant 7 jours.

Les pourcentages d'inhibition ont été calculés selon la formule :

$$I\% = (T - d / T) \times 100$$

**T**= diamètre de moisissure témoin.      **d**= diamètre de moisissure testée.

### **3.3.2- Test de thermo-résistance**

Un test de thermo-résistance a été réalisé pour les bactéries antagonistes obtenues à partir du test de confrontation par contact direct, et ce, pour vérifier la capacité de sporulation de souches bactériennes. En effet, La préparation des suspensions bactériennes a été réalisée à partir de jeunes colonies de 24 à 48 heures et diluée dans 9 ml d'eau physiologique stérile (NaCl 9%). Après agitation pendant 10 min, un traitement thermique à 80°C a été réalisé aux 2bactéries antagonistes pendant 12 minutes. Ce traitement thermique est utilisé pour éliminer toutes les formes végétatives et à récupérer la flore sporulée. 100µL de chaque dilution traitée ont été inoculés à la surface du milieu gélosé. Les boites ont été, ensuite incubées à 30° C pendant 24h et toute la flore bactérienne sporulée, aérobic anaérobic facultatif, est obtenue (Seldin *et al.* 1983). Celle-ci, correspond aux différentes bactéries formatrices d'endospores (endospore forming bacteria), y compris le genre *Bacillus*.

### **3.4- Identification de microorganismes sélectionnés**

L'identification d'isolats bactériens sélectionnés a été réalisée par observation macroscopique et microscopique en s'appuyant aussi sur des tests biochimiques en l'occurrence ; test de la catalase ; test du mannitol mobilité et un test Api.

### **3.4.1-Observation macroscopique**

L'étude de l'aspect macroscopique consiste une observation à l'œil nue des caractéristiques morphologiques en l'occurrence ; la taille (petite, moyenne, grande) ; la forme de la colonie (ronde, irrégulière, etc.) ; la couleur de la colonie ; l'opacité ; le type de la colonie et le relief (Camille, 2007).

### **3.4.2- Observation microscopique**

L'observation microscopique aide à définir certains caractères morphologiques et organisationnels de bactéries.

#### **➤ Observation à l'état frais**

Cette technique permet l'observation des colonies vivantes et la détermination de leur morphologie. La méthode consiste à déposer une goutte d'eau physiologique stérile sur une lame en verre propre, puis à l'aide d'une anse de platine stérile, un prélèvement à partir de jeunes colonies de 24heura 48 heures a été effectué, la colonie à identifier est apporté et dissocié dans la goutte d'eau physiologique, ensuite, recouverte par une lamelle (déposer délicatement la lamelle pour éviter la formation de bulles d'air). L'observation a été réalisée au microscope optique à l'objectif (X40) (Singleton, 2005).

#### **➤ Coloration au bleu de méthylène**

L'examen a été réalisé par l'utilisation de la méthode classique suivante : les suspensions de bactéries obtenues ont été étalées à l'aide d'une anse sur des lames en verre propres. Les lames ont été ensuite séchées à l'air, à proximité d'un bec bunsen, puis fixées par la chaleur en les passant deux ou trois fois sur la flamme. Les frottis préparés ont été colorés pendant 2 minutes au bleu de méthylène puis lavés à l'eau du robinet et séchés par le papier filtre. Puis l'examen microscopique a été effectué à l'aide d'un microscope optique à l'objectif (GX40) (Guiraud, 1998).

#### **➤ Coloration de Gram**

Afin de vérifier le type de paroi d'isolats bactériens obtenus et s'orienter pour l'identification nous avons réalisés la coloration de Gram. En effet, la coloration de Gram est un aspect important et essentiel de l'identification bactérienne et la vérification de la pureté de l'isolat. De ce fait, à partir de jeunes colonies âgées de 24 heures un frottis a été fixé à la

chaleur puis recouvert par le violet de Gentiane pendant une minute, puis il a été éliminé par l'ajout du Lugol pendant une minute. Le frottis a été ensuite décoloré avec de l'éthanol jusqu'à ce que le colorant cesse de s'échapper librement du frottis. A ce stade, les cellules Gram négatives seront incolores et les cellules Gram positives violettes. Par la suite, le frottis a été soumis à une contre coloration de 30 secondes à la fuchsine. Après un bref rinçage, le frottis a été séché puis examiné, à la suite, à l'objectif X 40 (Singleton, 2005).

### **3.4.2- Tests biochimiques (les tests d'orientations)**

Pour compléter l'identification morphologique, l'activité biochimique des isolats bactériens obtenus a été déterminée.

#### **➤ Test de la catalase**

Le test catalase sert à déterminer si la bactérie possède l'enzyme catalase servant à transformer l'eau oxygénée en eau et en oxygène. Il est mis en évidence par contact de la culture bactérienne avec une solution fraîche d'eau oxygénée. L'apparition de bulles confirme que la bactérie est catalase positive (Singleton, 2005). Pour cela, une goutte de suspension bactérienne a été déposée sur une lame à l'aide d'une pipette Pasteur. Ensuite, l'eau oxygénée (10 V) a été ajoutée. La présence de la catalase a été révélée par l'apparition immédiate de bulles de gaz qui correspondent à l'oxygène dégagé.

#### **➤ Etude de la fermentation du mannitol (test du mannitol mobilité)**

Ce milieu permet de détecter la fermentation du mannitol et la mobilité de la bactérie à étudier. Pour parvenir à tel résultat, les tubes ont été ensemencés par piqure centrale jusqu'au fond dans la gélose en culot à l'aide d'une pipette Pasteur. L'incubation a été effectuée à 30°C pendant 18 à 24 heures (Frenry *et al.*, 2007). Le virage de couleur au jaune indique que la bactérie est mannitol positif (le mannitol est fermenté). Tandis que, la bactérie est dite mannitol négatif, si le milieu reste rouge. La présence d'une faible teneur d'agar dans le milieu (gélose semi-molle) rend possible le déplacement de bactéries mobiles autour de la piqure centrale. La bactérie est mobile, S'il y a une diffusion dans la gélose, si la culture est uniquement au niveau de la piqure d'ensemencement la bactérie n'est pas mobile (Afssaps, 2008).

➤ **La galerie Api**

Vue qu'il y'a des tests biochimiques en commun entre la galerie Api 20 E et la galerie Api 50 CH spécifique pour les bactéries appartenant au genre *Bacillus*, et Selon la disponibilité de la galerie Api 20 E, et pour compléter l'identification une étude des bactéries sélectionnées a été effectuée avec cette dernière. En effet, le système API20 E Bio Mérieux (Appareillage et Procédé d'Identification) il s'agit d'une version miniaturisée et standardisée des techniques biochimiques conventionnelles d'identification bactérienne. Quand une suspension bactérienne de densité convenable est répartie dans les différentes alvéoles qui composent la micro-galerie (contenant de substrats déshydratés), les métabolites produits durant la période d'incubation se traduisent par des changements de couleur spontanés ou révélés par addition de réactifs (Camille, 2007).

➤ **Préparation de la galerie**

A partir d'une culture pure (de 18 à 24 heures) une suspension bactérienne a été préparée dans un tube contenant 10mL d'eau distillée stérile. L'inoculation de la galerie a été réalisée en suivant le mode opératoire du fabricant, en notant que : pour les tests CIT, VP, GEL, les tubes et les cupules doivent être remplis par la suspension bactérienne, tandis que pour les tests ADH, LDC, ODC, H<sub>2</sub>S et URE, les cupules ont été remplies avec huile de paraffine. L'incubation de la galerie a été effectuée à 30°C pendant 24 heures. La lecture des réactions de la galerie a été effectuée après l'incubation, en appliquant le tableau de lecture principale (Annexe3) (Camille, 2007).

### **3.5- Test de biocontrôle**

Afin de vérifier la capacité de souches bactériennes obtenues, et qui sont (*Bacillus sp1. et Bacillus sp2.*) de lutter contre les agents phytopathogènes un test de biocontrôle a été effectué sur des plantules de tomates ramenées à partir de la région de (Tamalous), âgées de 5 semaines appartenant à la variété Blacmine. En effet, Ce test a été appliqué dans des conditions de pots sur les racines de plantules de tomate en plongeant ces dernières dans 10 mL de chaque suspension bactérienne. Dans chaque pot (24 cm x 20 cm), trois plantules ont été repiquées. L'arrosage a été effectué tous les 2 jours en utilisant de l'eau du robinet. Cette expérience a été effectuée selon la méthode de Mouria et al. (2012). Ensuite, les feuilles des plantules ont été pulvérisées par une suspension sporale (10<sup>6</sup>spores/mL) de chaque agent phytopathogène en l'occurrence : *Aspergillus sp1.*, *Aspergillus sp2.*, *Pythium sp1.*, *Pythium*

*sp2.* et *Alternaria sp.* Enfin, après 1 mois la sévérité de la maladie, la taille de plantes et le nombre de feuilles ont été évaluées.

L'étude statistique a été réalisée en utilisant l'Excel, et ce dans le but d'évaluer l'effet des bactéries sur la stimulation des plantules de la tomate et la protection contre les maladies phytopathogènes.

### **3.6- Détection des enzymes de dégradation de la paroi fongique**

Afin de vérifier la capacité de souches bactériennes obtenues de produire des enzymes de dégradation de la paroi fongique des analyses de l'activité enzymatiques ont été effectuées en l'occurrence : (l'activité amylolytique ; protéolytique ; lipolytique et chitinasique). En effet, l'activité enzymatique de souches sélectionnées a été testée qualitativement et peu quantitativement sur des milieux solides contenant le substrat à dégrader, en l'occurrence : l'amidon soluble ; le lait lyophilisé ; la tributyrine et la chitine colloïdale, pour détecter la présence ou l'absence de l'amylase ; la protéase ; la lipase et la chitinase respectivement.

La présence de l'activité enzymatique se vérifie par la formation d'un halo claire autour de colonie bactérienne (Ariffin *et al.*, 2006).

#### **3.6.1- Activité amylolytique**

La détection de la production d'amylase a été effectuée à l'aide de la gélose nutritif additionnée de 0.2% d'amidon soluble. Les souches bactériennes ont été placées au centre de la boîte de Pétri et puis l'incubation a été effectuée pendant 48 heures à 37°C. La révélation a été réalisée par une inondation de la boîte de Pétri par une solution d'Iode (Gopinath *et al.*, 2017). En fait, la présence d'une zone claire autour des colonies bactériennes indique la capacité de la souche à hydrolyser l'amidon.

#### **3.6.2- Activité protéolytique**

L'activité de protéase a été évaluée en utilisant le lait écrémé de caséine comme source de carbone (Larpen et Larpen, 1985). En outre, la recherche de l'activité caséolytique est notamment utile dans l'identification des *Bacillus* (Camille., 2007). De ce fait, un test d'hydrolyse de caséine a été effectué sur gélose au lait (Annexe1). Les bactéries ont été ensuite inoculées en un seul disque sur ce milieu, après une période de croissance de 72 heures à 30°C, 2 ml de HCl (0,1 mol l<sup>-1</sup>) ont été ajoutés sur le milieu. La présence de halo clair autour des colonies signifie une production de protéase (Carrim *et al.*, 2006).

### **3.6.3- Activité lipolytique**

Afin de détecter la production de lipase et d'estérase, On fait tous d'abord un test de précipitation en utilisant un milieu de culture de base additionné de Tween 20 et Tween 80 respectivement. Le principe de cette méthode se base sur 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 souches sélectionnées ont été testé par inoculation sur un milieu de culture composé de : 10 g de peptone, 5 g de NaCl<sub>2</sub>, 0,1 g de CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O, 20 g d'agar et 10 ml (v / v) de Tween 20/80. Après, l'incubation a été réalisée à 37°C pendant 2 à 4 jours. Une précipitation blanche autour de la colonie indique une activité lipasique ou estérasique (Ramnath *et al.*, 2017).

### **3.6.4- Activité chitinase**

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'évaluation de l'activité chitinolytique a été réalisée sur le milieu chitine-agar et incubées à 30 °C pendant 5 jours après inoculation des disques au centre. Cependant, chaque halo clair autour de souche antagoniste indique l'activité chitinolytique (Nihorimbere *et al.*, 2013).

## **3.7- Fermentation en milieu alternatif à base de farine de noyaux de dattes**

Afin d'utiliser les souches bactériennes obtenues dans la lutte biologique en future, une fermentation liquide a été effectuée sur trois milieux en l'occurrence : deux milieux déjà utilisés dans ce domaine de l'agriculture, et un milieu alternatif proposé à base de farine de noyaux de dattes comme seule source de carbone et d'azote.

### **3.7.1-Milieu de culture**

Les souches sélectionnées ont été cultivées sur le milieu de Jacques et al. Appelé milieu optimisé (Annexe 1), sur le milieu Landy (Akpa, 2001) et sur un milieu Alternatif préparé à base de farine de noyaux de dattes, ces derniers ont été choisis pour leur richesse en matière sèche, une bonne source de : glucide, cellulose brut, matière grasse, protéine, et les minéraux.

La préparation du milieu a été réalisée comme suite : les noyaux de dattes ont été lavés, séchés et broyés. Ensuite, 40 grammes de la farine de noyaux de dattes obtenues ont été infusés en les faisant bouillir dans 1 litre d'eau distillée stérile. Par la suite le bouillon obtenu a été filtré à travers un coton à fromage. La stérilisation de trois milieux a été effectuée à l'autoclave à 121°C pendant 20 minutes.

### **3.7.2-Préparation de l'inoculum**

La pré-culture des souches sélectionnées a été réalisée par l'inoculation des 3 milieux de cultures (milieu optimisé, milieu Landy, et un milieu alternatif) dans des Erlenmeyers de 250 mL, Contenant 50 ml de milieu. Cette préparation est incubée à 30°C sous agitation de 130 rpm pendant 24h (Akpa, 2001).

### **3.7.3- Culture bactérienne**

Les bactéries ont été cultivées dans 50 mL de milieu (optimum, landy et alternatif) dans des Erlenmeyers de 250mL, agités à 130 rpm à 30°C. Les conditions de culture adoptées sont les conditions standards pour le développement du genre *Bacillus*. Pour l'ensemencement de la culture, 1 mL d'une pré-culture cultivée dans les mêmes conditions pendant 24 h a été utilisée. Par la suite les cultures bactériennes ont été arrêtées après 72heures (Akpa, 2001).

### **3.7.4- Évaluation des paramètres de croissance et de production de Métabolites**

À chaque 24 heures, des analyses de surveillance de fermentation ont été effectuées en l'occurrence : la vérification de l'absence de contamination, la concentration de la biomasse et la concentration de métabolites. Toutes les expériences ont été réalisées en trois répétitions.

#### **➤ Evaluation de la biomasse**

Deux méthodes de mesure ont été utilisées pour évaluer la biomasse, et qui sont : (mesure de la densité optique et la détermination de la matière sèche cellulaire).

#### **-Mesure de la densité optique**

La croissance cellulaire est suivie par la mesure de la densité optique de la suspension cellulaire des souches sélectionnées (*Bacillus sp1.*, *Bacillus sp2.*) par spectrophotomètre (JENWAY 6300) (Annexe 4) à 600 nm dans une cuve en verre. Le milieu de culture stérile sert de référence (Akpa, 2001).

### -Détermination de la matière sèche cellulaire

Après homogénéisation de la culture des souches sélectionnées, 1 ml est filtré sous vide à l'aide de filtre de 0,45 µm. Le retentât et le filtre ont été transférés dans une boîte de Pétri préalablement taré avec le filtre non utilisé (Pc). La boîte de Pétria été placée dans un lyophilisateur (LABCONCO) (Annexe 5) avant d'être pesée à nouveau (Ps). La valeur de la matière sèche cellulaire (mg.ml<sup>-1</sup> ou g.l<sup>-1</sup>) est la différence entre Ps et Pc (Akpa ,2001).

#### ➤ Analyse des métabolites

L'analyse présomptive des surnageants obtenues à partir de la fermentation a été effectuée comme suite : les surnageants ont été filtrés sous vide à l'aide de filtres stériles de 0.45µm de diamètre. Les extraits obtenus ont été analysés par spectrophotomètre.

### 3.8- L'activité antibactérienne

Afin de vérifier la capacité de souches *Bacillus sp1.* et *Bacillus sp2.* à produire des métabolites antimicrobienne. L'activité antibactérienne de souches bactériennes sélectionnées, a été testée vis-à-vis de quatre bactéries pathogènes (deux bactéries Gram négative et deux bactéries Gram positive, (tableau 2) provenant de laboratoire de recherche (LaMyBAM) : Laboratoire de Mycologie, de Biotechnologie et de l'Activité Microbienne.

**Tableau3** Les différentes bactéries tests et leurs code ATCC.

Souches bactériennes	Gram des Souches	Références
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Négative	ATCC 27853
<i>Escherichia coli</i>	Négative	ATCC 25922
<i>Enterococcus sp.</i>	Positive	/
<i>Bacillus subtilis</i>	Positive	ATCC 6633

#### 3.8.1-Méthode de puits (méthode de Barefoot et Kaenhammer, 1983)

A l'aide d'un écouvillon stérile les bactéries tests, ont été ensemencées en stries serrées sur toute la surface de boîtes contenant le milieu Muller -Hinton. Après séchage de la surface, quatre puits de 4 mm de diamètre ont été creusés stérilement à l'aide d'une pipette Pasteur. Ensuite, les puits ont été remplies par 100 µL du surnagent et de filtrat de culture de chaque bactérie sélectionnées (*Bacillus sp1.*, *Bacillus sp2.*) obtenue à partir de fermentation effectuée précédemment (milieu de référence « Optimum ») (Doumandji *et al.*, 2010). Les boîtes de Pétri ont été incubées à 37°C pendant 24 h.



### **3.8.2- La lecture**

Après l'incubation, la présence de zone d'inhibition est observée autour de puits contenant les souches sélectionnées produisant des produits antibactériens actifs contre la souche test. L'absence de zones d'inhibition claires autour des puits, indique un résultat négatif qui montre que les bactéries sont résistantes aux substances produites par les souches bactériennes sélectionnées. Plus la zone d'inhibition est grande, plus l'activité antibactérienne est importante. Après l'incubation, la présence ou l'absence des zones de lyses est vérifiée ensuite mesurés au millimètre (Hwanhlem *et al.*, 2011).

### **3.9- 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 quasi totale du produit concerné, qui est ensuite conservé sous vide à la température ambiante. La biomasse de bactéries obtenues, après une fermentation de 3 jours a été lyophilisée et transformés en poudre à l'aide d'un lyophilisateur.

# *Résultats*

## 4- Résultats

Ce travail porte sur l'isolement et la sélection des microorganismes à effet antagoniste à partir du sol rhizosphérique de la pomme de terre dans le cadre de les utiliser en tant qu'agent de bio contrôle contre les agents phytopathogènes isolés à partir de différentes parties de pomme de terre qui montraient plusieurs symptômes de maladies.

### 4.1- Isolement des agents phytopathogènes

L'isolement a été effectué à partir de feuilles, de tiges, et de racines des plantules de la pomme de terre présentant des symptômes de maladies phytopathogènes. En effet, cinq isolats fongiques ont été obtenus en l'occurrence ; M1, M2, A1, A3 et A4.

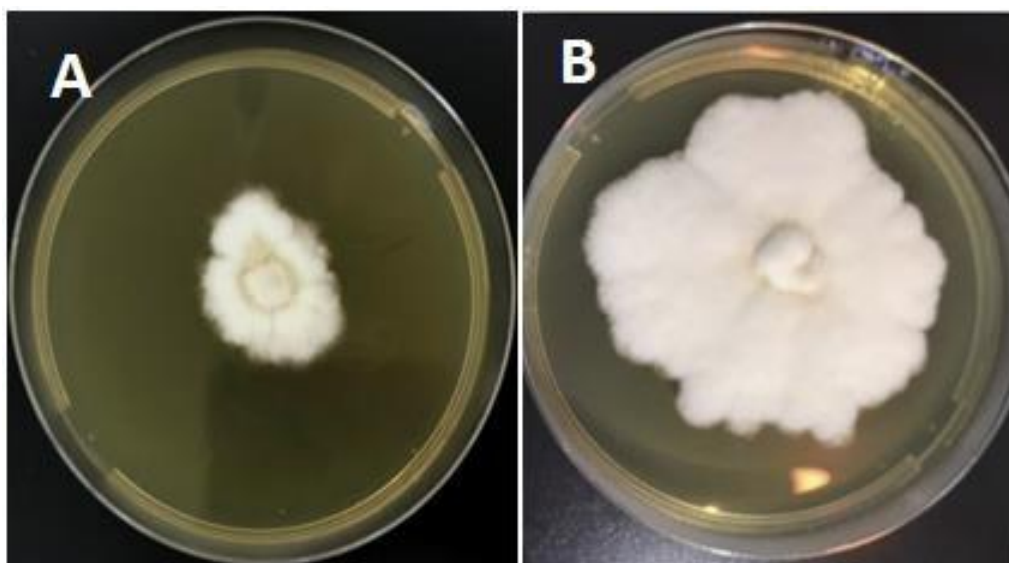
### 4.2- Identification des agents phytopathogènes

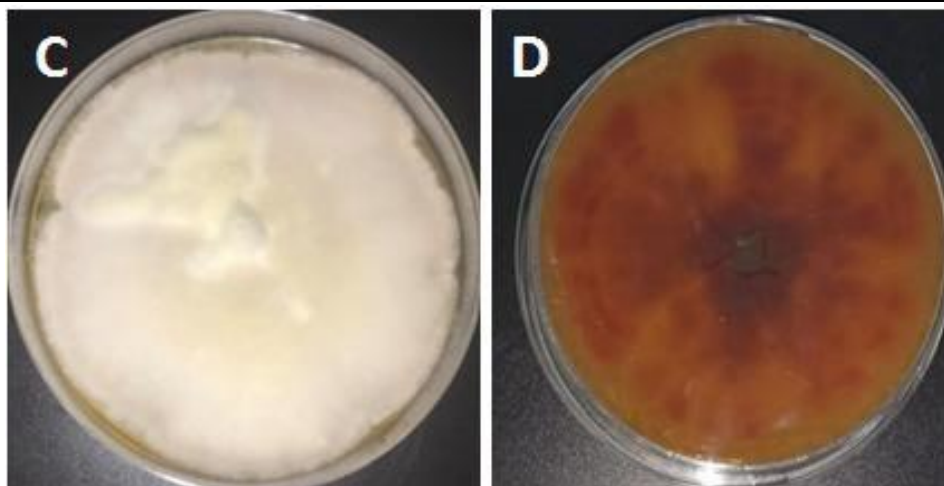
L'identification des agents phytopathogènes a été réalisée par l'observation macroscopique et microscopique des isolats fongiques obtenus.

#### 4.2.1- Observation macroscopique

L'étude morphologique des isolats fongiques sur milieu PDA après le 3, le 5 et le 7<sup>ème</sup> jour de développement (figure 22) a permis de révéler les caractères suivants :

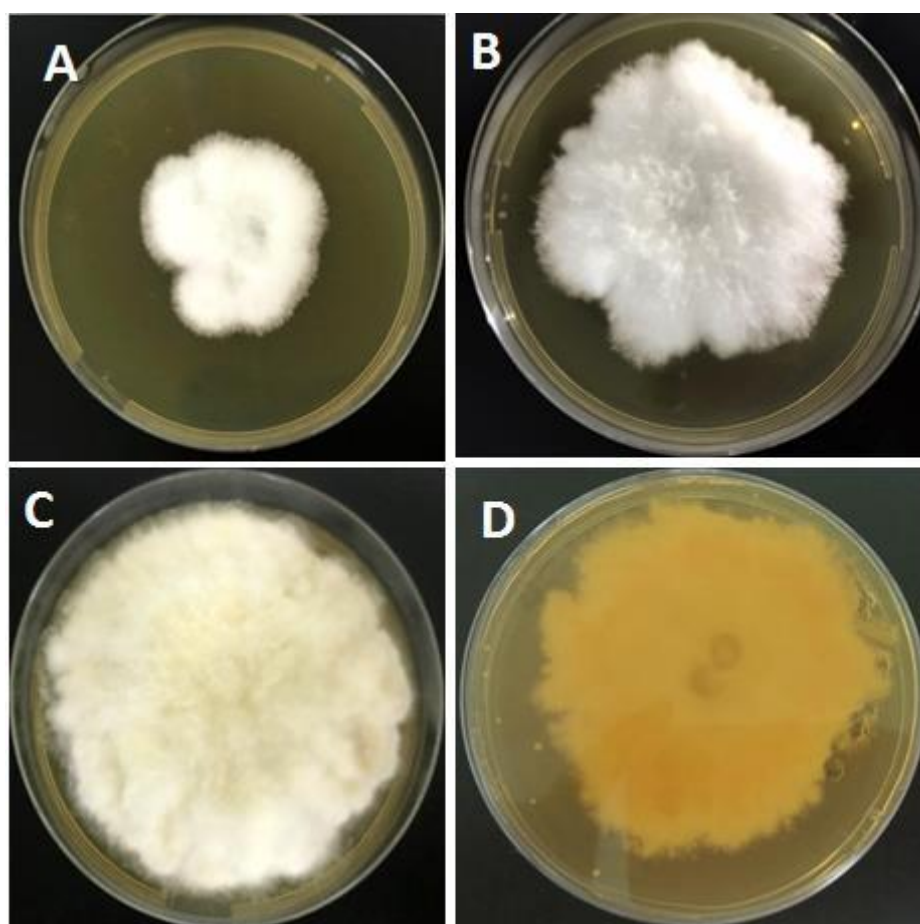
L'isolat M1 est caractérisé par une colonie de développement plus au moins longue, de couleur recto blanche cassé et de verso marron, une surface cotonneuse, et des reliefs surélevés, avec des bordures mycéliennes irrégulières.





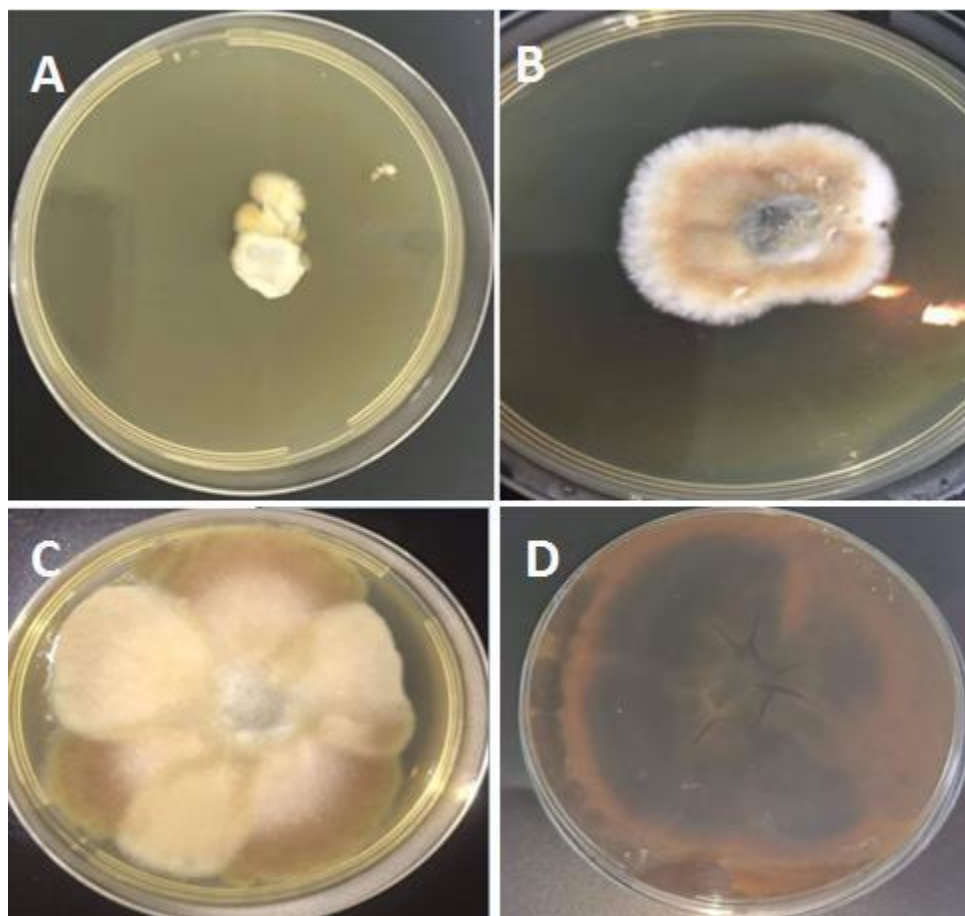
**Figure 22** Aspect macroscopique de la moisissure M1 : Recto (A, B, C) après le 3, le 5 et le 7<sup>ème</sup> jour d'incubation à 30 °C sur milieu PDA, verso (D).

L'isolat M2 a montré une colonie avec une croissance plus au moins rapide, de couleur blanche et de verso beige, une surface cotonneuse, des reliefs surélevés, et des bordures mycéliennes irrégulières.



**Figure 23** Aspect macroscopique de la moisissure M2 : Recto (A, B, C) après le 3, le 5 et le 7<sup>ème</sup> jour d'incubation à 30 °C sur milieu PDA, verso (D).

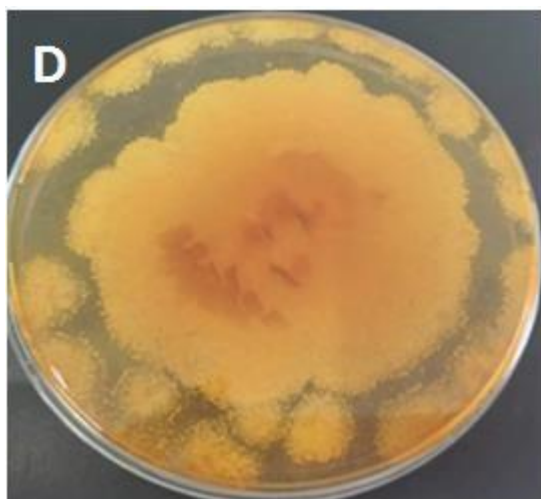
L'isolat A1 a montré une colonie de croissance lente, d'allure cotonneuse, de couleur verte et de verso marron, des reliefs plats, avec des bordures mycéliennes irrégulières.



**Figure 24** Aspect macroscopique de la moisissure A1 : Recto (A, B, C) après le 3, le 5 et le 7<sup>ème</sup> jour d'incubation à 30 °C sur milieu PDA, verso (D).

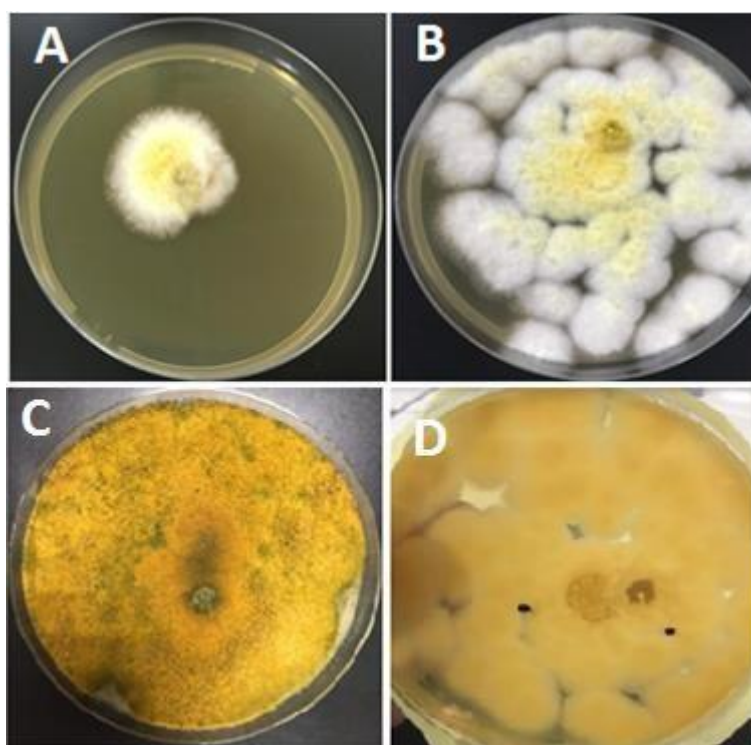
L'isolat A3 a montré une colonie de croissance lente, de couleur rose, de verso beige, un aspect poudreux, des reliefs plats, avec des bordures mycéliennes irrégulières.





**Figure 25** Aspect macroscopique de la moisissure A3 : Recto (A, B, C) après le 3, le 5 et le 7<sup>ème</sup> jour d'incubation à 30 °C sur milieu PDA, verso (D).

L'isolat A4 a montré une colonie avec un développement rapide, de couleur blanche jaunâtre, de verso beige, une surface granuleuse, des reliefs surélevés et des bordures mycéliennes irrégulières.



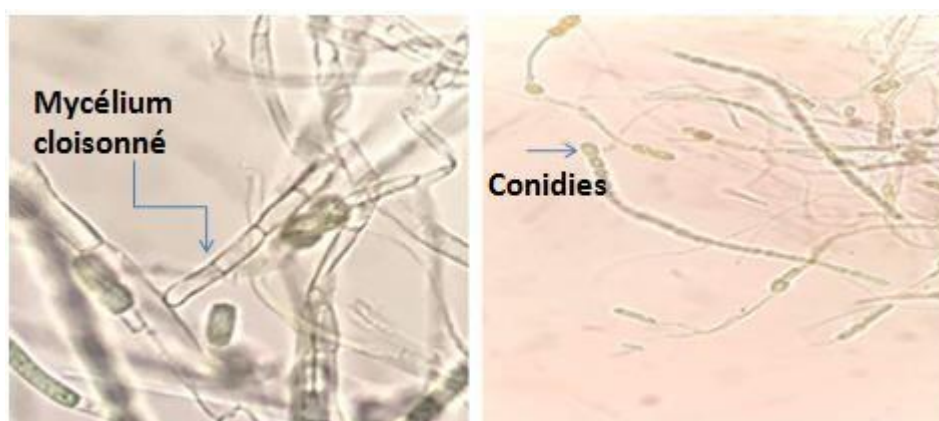
**Figure 26** Aspect macroscopique de la moisissure A4 : Recto (A, B, C) après le 3, le 5 et le 7<sup>ème</sup> jour d'incubation à 30 °C sur milieu PDA, verso (D).



#### 4.2.2- Observation microscopique

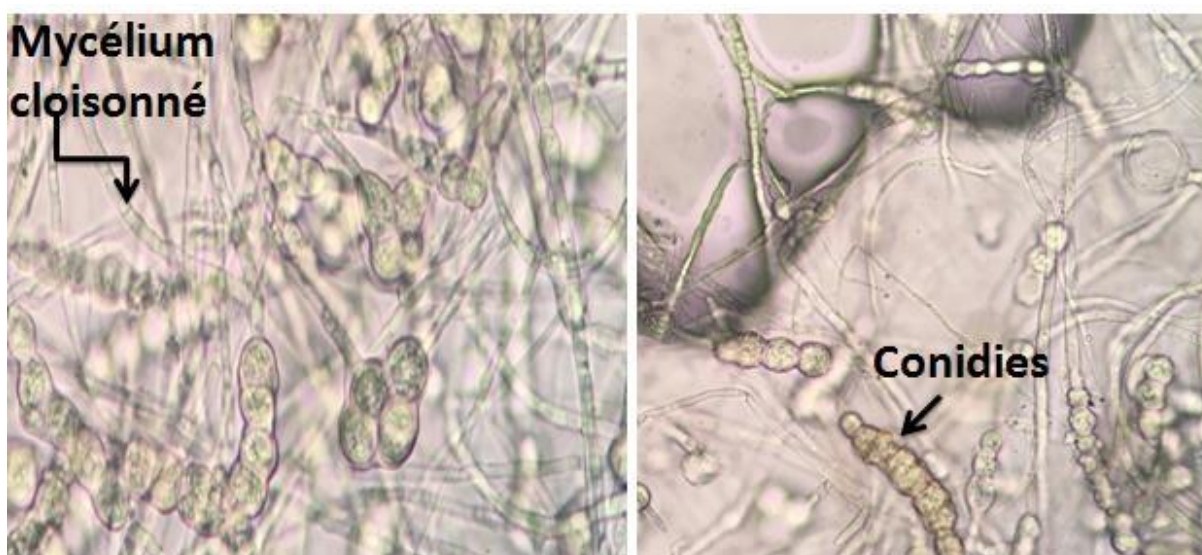
L'observation des moisissures sous microscope a révélé les caractéristiques suivantes :

L'isolat M1 a montré la présence d'un thalle cloisonné et ramifié, des conidies rondes (figure 27). Les résultats de cette étude préliminaire (aspect macroscopique et microscopique) indiquent que l'isolat M1 appartient au genre *Pythium*.



**Figure 27** Etude microscopique de l'isolat filamenteux M1 (GX 40).

L'isolat M2 a montré la présence des sporanges ovoïdes et des extrémités très proéminentes appelées papilles (Figure 28). Les résultats de cette étude préliminaire ; aspect macroscopique et microscopique indiquent que l'isolat M2 appartient au genre *Pythium*.



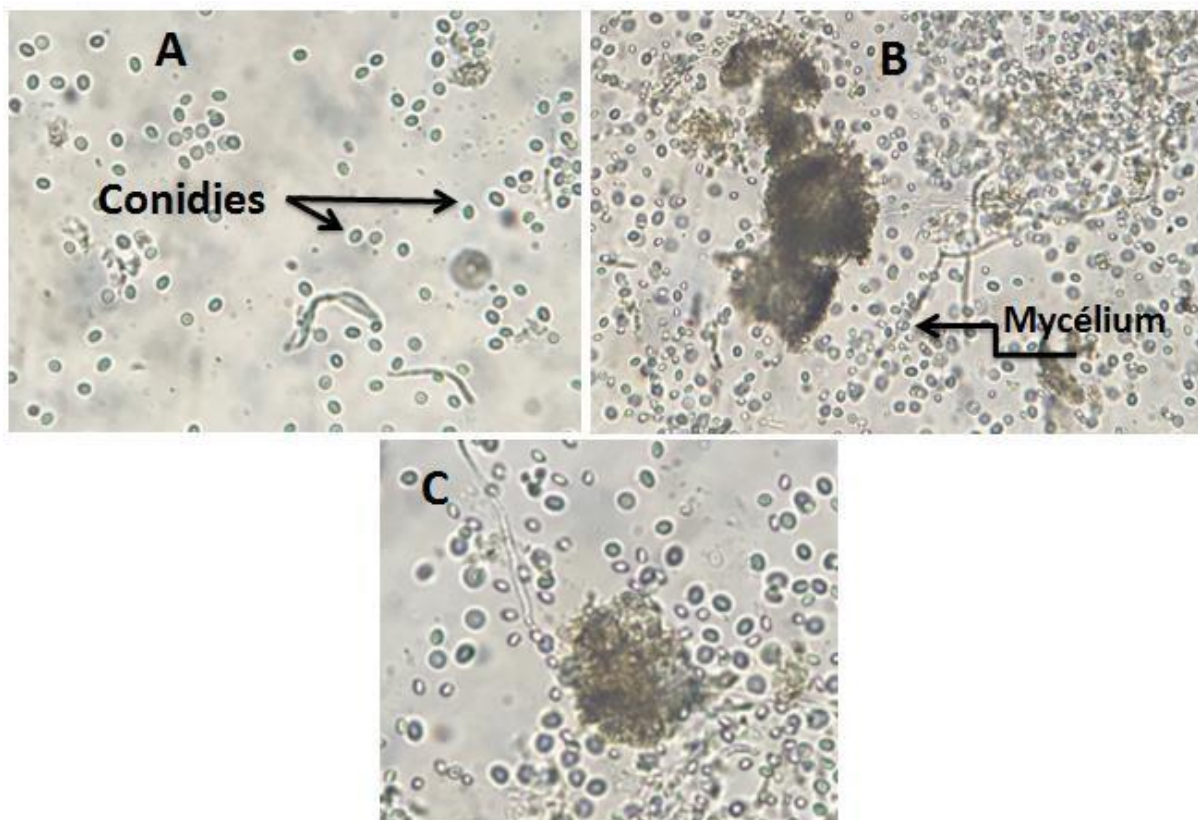
**Figure 28** Etude microscopique de l'isolat filamenteux M2 (GX 40).

L'isolat A1 a montré la présence d'un mycélium cloisonné, des conidies de forme ovale, de couleur brune jaunâtre, avec 3 transepta et 1-2 longisepta ou oblique (figure 29). Les résultats de cette étude préliminaire ; aspect macroscopique et microscopique indiquent que l'isolat A1 appartient au genre *Alternaria*.



**Figure 29** Etude microscopique de l'isolat filamenteux A1 (GX 40).

L'isolat A3 a montré la présence d'une tête et un hyphe non sépté et des conidies rondes (Figure 30). Les résultats de cette étude préliminaire ; aspect macroscopique et microscopique indiquent que l'isolat A3 appartient au genre *Aspergillus*.



**Figure 30** Etude microscopique de l'isolat filamenteux A3 (GX 40).



L'isolat A4 a révélé la présence de conidiophore lisse, verdâtre dans sa moitié supérieure et très longue. Les phialides insérées sur la vésicule par l'intermédiaire des métules disposées sur tout le pourtour de la vésicule, et des conidies sont globeuses (Figure 31).

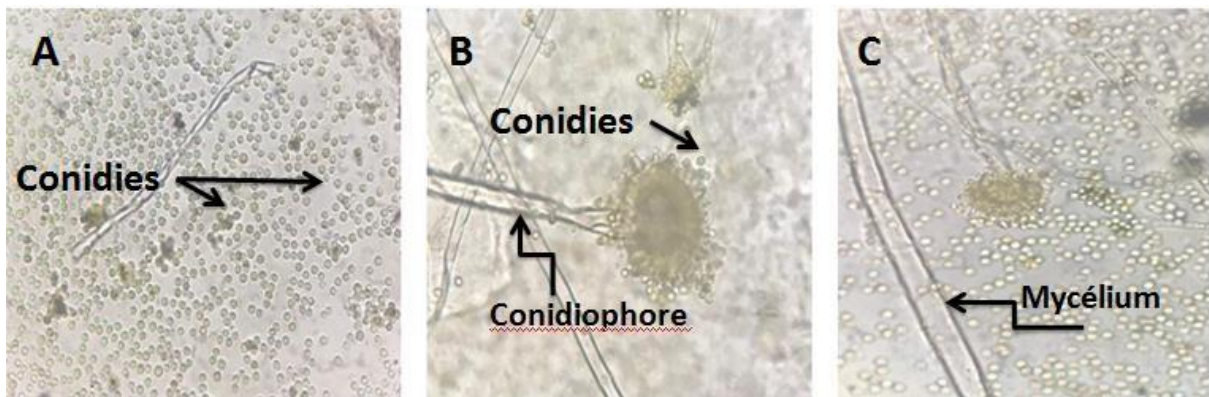


Figure 31 Etude microscopique de l'isolat filamenteux A4 (GX 40).

Les résultats de cette étude préliminaire ; aspect macroscopique et microscopique indiquent que l'isolat A4 appartient au genre *Aspergillus*.

#### 4.3- Test de phytopathogénicité

Ce test a été réalisé afin de confirmer la pathogénicité des souches *Pythium sp1.*, *Pythium sp2.*, *Alternaria sp.*, *Aspergillus sp1.*, et *Aspergillus sp2.*

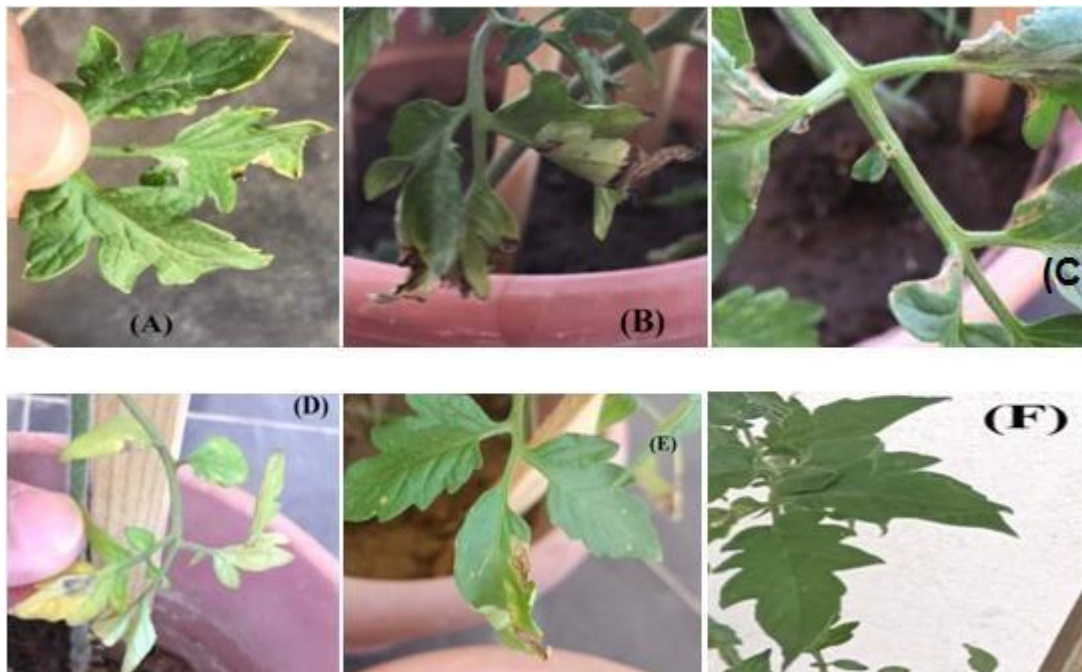


Figure 32 Symptômes apparaissent après 20 jours d'inoculation par : (A) *Pythium sp1.* (B) *Pythium sp2.* (C) *Alternaria sp.* (D) *Aspergillus sp1.* (E) *Aspergillus sp2.* et (F) témoin.

L'apparition des symptômes sur les plantules seines de tomate (variété : blacmine) après 20 jours d'inoculation par des suspensions sporales de *Pythium sp1.*, *Pythium sp2.*, *Alternaria sp.*, *Aspergillus sp1.*, et *Aspergillus sp2.* a été représentée par des taches, des brûlures et des lésions sur les feuilles et les tiges (figure 32).

Le tableau 4 représente le pourcentage de sévérité des maladies causées par les agents phytopathogènes ; *Pythium sp1.*, *Pythium sp2.*, *Alternariasp.*, *Aspergillus sp1.*, et *Aspergillus sp2.* Le degré de sévérité des maladies phytopathogènes est de 76%.



**Tableau 4** Pourcentage de sévérité des maladies causées par les agents phytopathogènes.




Souches	A1	A3	A4	M1	M2
P %	76%	76%	76%	76%	76%

• **Ré isolement de l'agent phytopathogène**

Un ré-isolement a été effectué pour confirmer que les symptômes observés après l'inoculation par les agents phytopathogènes sont similaires à ceux obtenus avec les cultures initiales.

**Tableau 5** Résultats de ré-isolement des agents phytopathogènes.

Souches	Photos
<i>Pythium sp1.</i>	
<i>Pythium sp2.</i>	

<p><i>Alternaria sp.</i></p>	
<p><i>Aspergillus sp1.</i></p>	
<p><i>Aspergillus sp2.</i></p>	

Le résultat de ce test confirme la pathogénicité de souches fongiques à savoir : *Pythium sp1.*, *Pythium sp2.*, *Alternaria sp.*, *Aspergillus sp1.*, *Aspergillus sp2.*

#### 4.4- Isolement de l'agent antagoniste

Vingt isolats bactériens sont obtenus à partir des échantillons du sol de la zone de la rhizosphère des plantules saines de la pomme de terre.

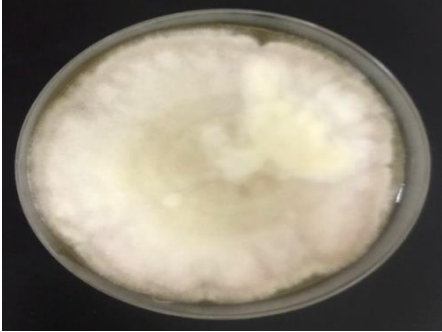
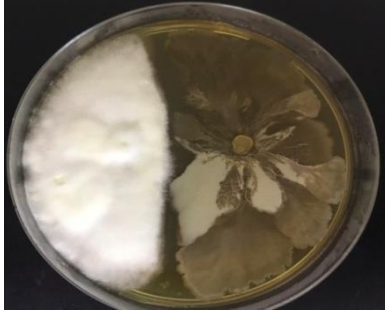
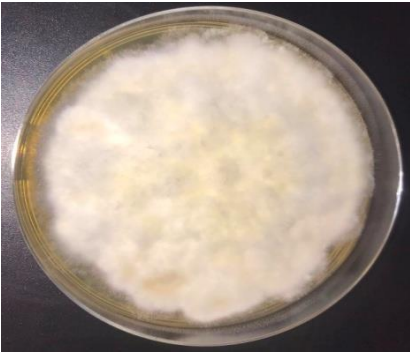
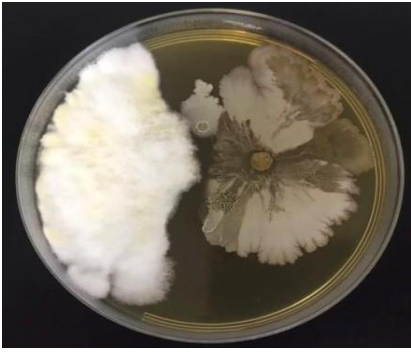




##### 4.4.1- sélection de l'agent antagoniste

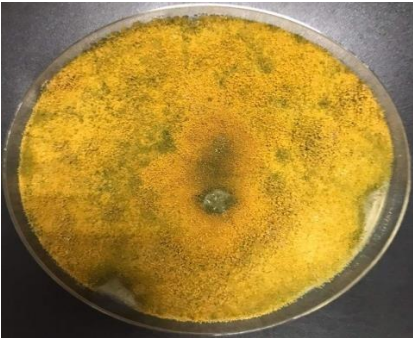

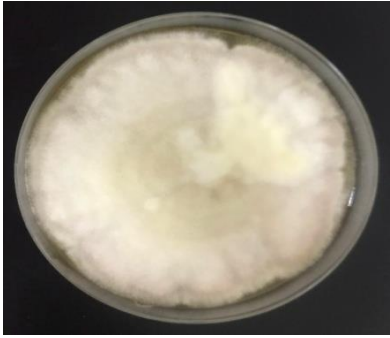
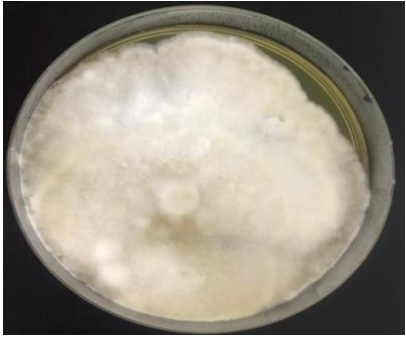
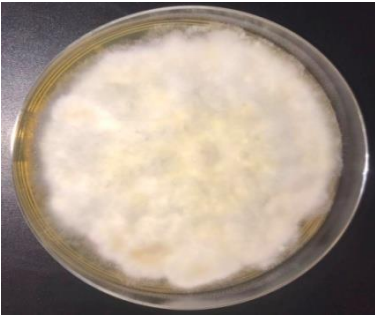



###### ➤ Confrontation par contact direct

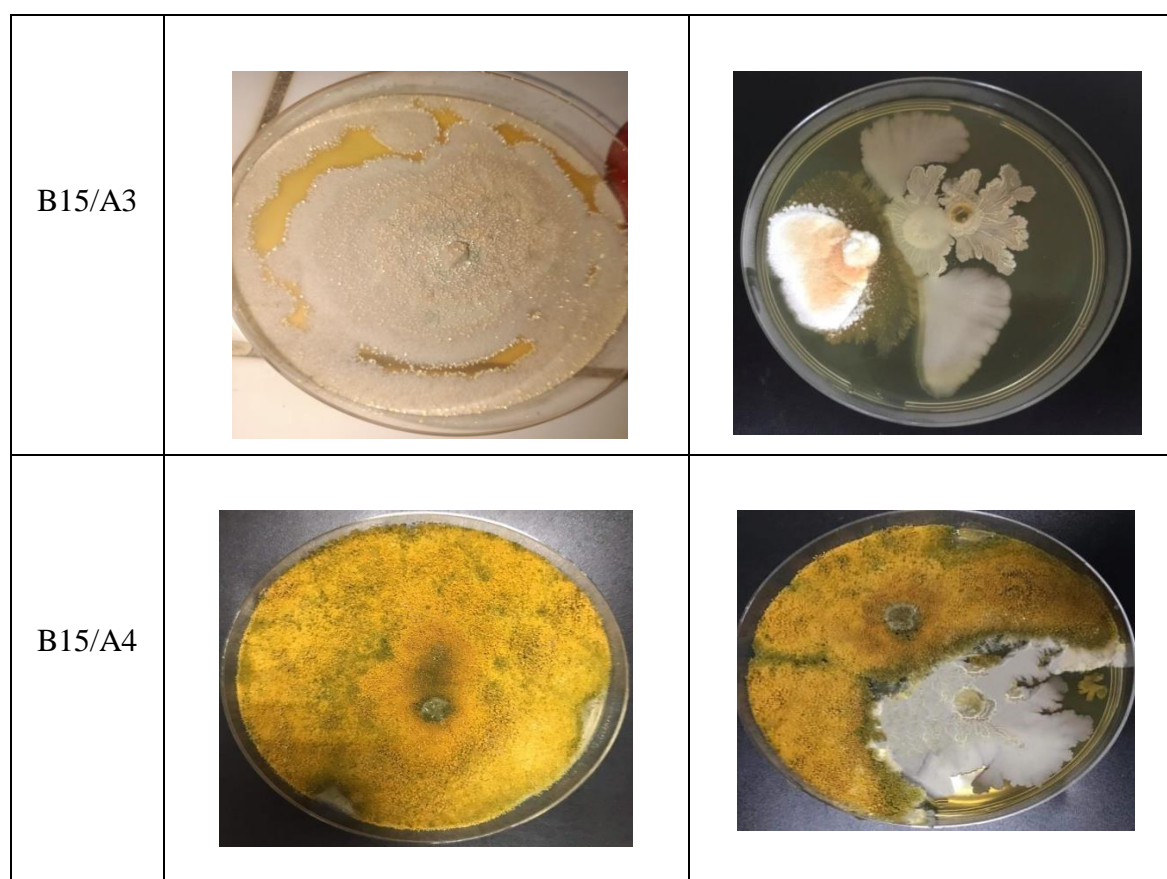
Le résultat de ce test montre que deux souches seulement (B1, B15) ont inhibé la croissance du mycélium de cinq agents phytopathogènes ; *Pythium sp1.*, *Pythium sp2.*, *Alternaria sp.*, *Aspergillus sp1.*, et *Aspergillus sp2* (Tableau 6).



**Tableau 6** Inhibition *in vitro* de la croissance des agents phytopathogènes (*Pythium sp1.*, *Pythium sp2.*, *Alternaria sp.*, *Aspergillus sp1.*, *Aspergillus sp2*) par les isolats bactériens (B1, B15) après 10 jours.

Isolats	Témoins	Test antagoniste
B1/M1		
B1/M2		
B1/A1		
B1/A3		

B1/A4	 A petri dish showing a dense, uniform layer of bright yellow mold covering the entire surface of the agar.	 A petri dish showing a dense, uniform layer of bright yellow mold covering most of the surface. A distinct, circular area of white, fluffy growth is visible in the center.
B15/M1	 A petri dish showing a dense, uniform layer of white, fluffy mold covering the entire surface of the agar.	 A petri dish showing a dense, uniform layer of white, fluffy mold covering the entire surface of the agar.
B15/M2	 A petri dish showing a dense, uniform layer of white, fluffy mold covering the entire surface of the agar.	 A petri dish showing a dense, uniform layer of white, fluffy mold covering most of the surface. A distinct, circular area of yellow, granular growth is visible on the right side.
B15/A1	 A petri dish showing a dense, uniform layer of white, fluffy mold covering the entire surface of the agar.	 A petri dish showing a dense, uniform layer of white, fluffy mold covering most of the surface. A distinct, circular area of yellow, granular growth is visible in the center.



Le tableau 6 montre que la croissance mycélienne des souches témoins est plus importante en comparant avec les souches de boîtes d'interaction.

Le pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne a été mesuré (tableau 6).

D'après les résultats présentés ci-dessous (tableau 7), le taux d'inhibition des agents phytopathogènes varie entre 33 et 69%, avec un meilleur effet inhibiteur de la souche B15 et B1 sur A3 ; 69 et 60% respectivement.

**Tableau7** Taux d'inhibition de la croissance mycélienne par confrontation directe

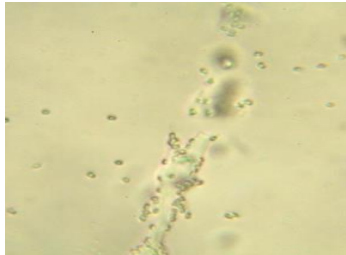

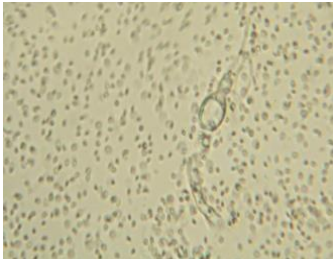
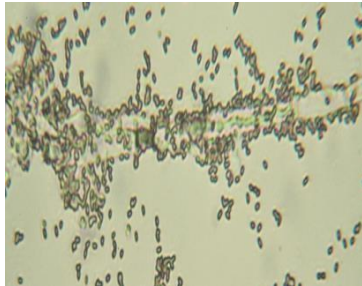
Moisissures Isolats Bactériens	Taux d'inhibition %				
	<i>Pythium sp1.</i>	<i>Pythium sp2.</i>	<i>Alternaria sp.</i>	<i>Aspergillus sp1.</i>	<i>Aspergillus sp2.</i>
B1	55%	52%	54%	60%	46,2%
B15	Pas d'effet	45%	Pas d'effet	69%	47,5%

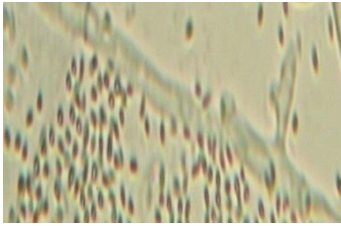

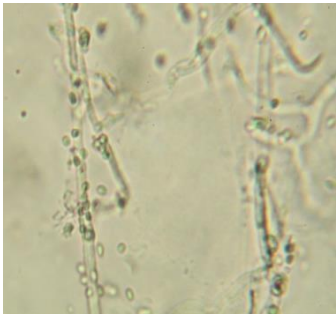
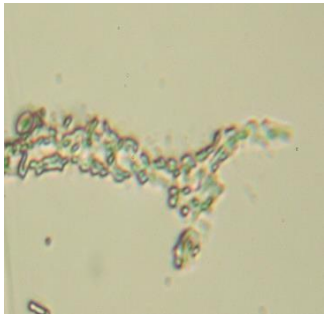
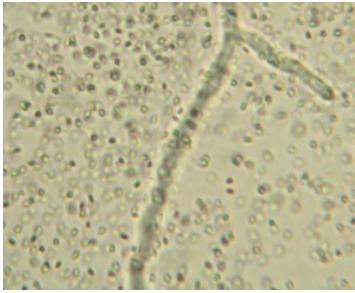
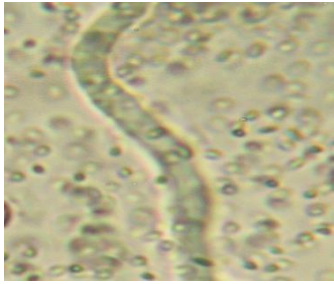


• Etude microscopique de l'interaction d'antagonisme

L'effet antagoniste de deux bactéries sélectionnées B1 et B15 sur les agents phytopathogènes (*Pythium sp1.*, *Pythium sp2.*, *Alternaria sp.*, *Aspergillus sp1.* et *Aspergillus sp2.*) a été observé sous microscope, les images présentées dans le tableau 8 montrent un enroulement de ces bactéries autour des agents phytopathogènes (B1 avec *Pythium sp1.* et *Alternaria sp.1*) et (B15 avec *Pythium sp2.* et *Aspergillus sp1*) ce qui a provoqué une dégradation de la paroi de ces dernières, ainsi on a constaté une pénétration de ces bactéries à l'intérieur de filaments des moisissures (B1/*Aspergillus sp1.* et *Aspergillus sp2.* et B15 avec *Pythium sp1.* et *Aspergillus sp2.*) cette interaction a aussi provoqué une déformation de spores (B1 avec *Pythium sp2.* et B15 avec *Alternaria sp.*).

**Tableau 8** Etude de l'interaction entre bactéries et moisissures phytopathogènes

Souches	B1	B15
<i>Pythium sp1.</i>		
Observation	dégradation de la paroi fongique de l'hyphe.	Pénétration des bactéries antagonistes à l'intérieur de l'hyphe.
<i>Pythium sp2.</i>		
Observation	Déformation de la spore.	Formation de biofilme autour de l'hyphe ce qui a provoqué la dégradation de la paroi fongique.

<p><i>Alternaria sp.</i></p>		
<p>Observation</p>	<p>Encerclement de l'hyphe par les bactéries.</p>	<p>Retricement de la spore fongique.</p>
<p><i>Aspergillus sp1.</i></p>		
<p>Observation</p>	<p>Infiltration de bactéries à l'intérieur de l'hyphe.</p>	<p>Dégradation du filament fongique.</p>
<p><i>Aspergillus sp2.</i></p>		
<p>Observation</p>	<p>Intrusion des bactéries à l'intérieur de l'hyphe</p>	<p>Pénétration des bactéries antagonistes à l'intérieur du filament fongique.</p>



#### 4.4.2- Test de thermo-résistance

Ce test a permis d'obtenir le développement de 2 isolats bactériens B1 et B15 après 24 h d'incubation à 30°C. Celle-ci, correspond aux différentes bactéries formatrices d'endospores, y compris le genre *Bacillus*.

#### 4.5-Identification des microorganismes sélectionnés

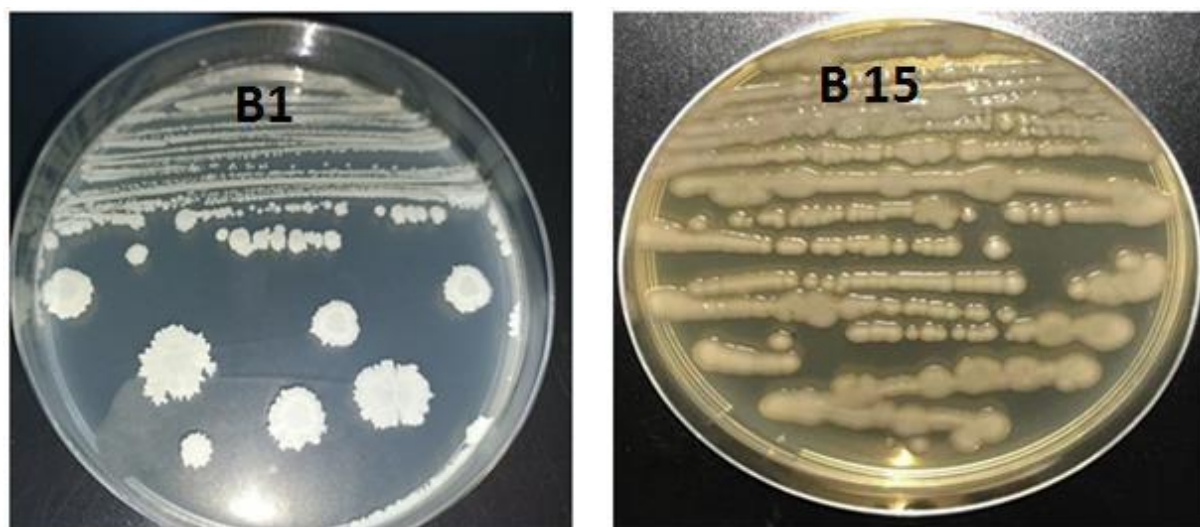
Les caractères morphologiques et culturaux des isolats sélectionnés (B1 et B15) ont été étudiés après ensemencement sur milieu GN après 24h d'incubation à 30°C.

##### 4.5.1- Aspect macroscopique

L'observation des isolats sélectionnés (B1 et B15) a révélé différents aspects morphologiques (forme, couleur, taille, élévation, contour, surface, opacité et le relief) (figure 33, tableau 9).

**Tableau 9** Caractères macroscopiques des isolats bactériens sélectionnés (B1 et B15).

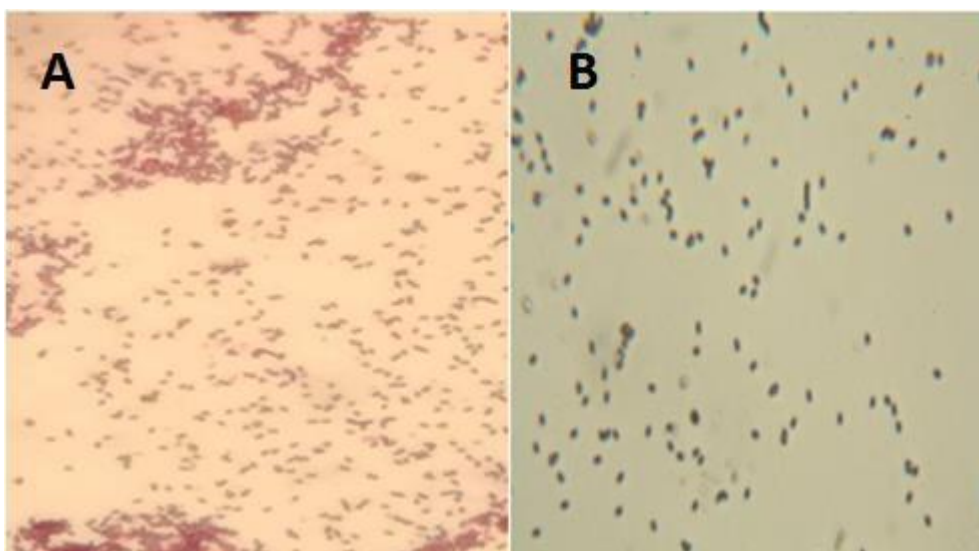
Isolats	Forme	Couleur	Taille	Elévation	Contour	Surface	Opacité	Consistance
B1	Rhizoïde	Crème	Moyenne	Plate	Lobé	Rugueuse	Opaque	Muqueuse
B15	Circulaire	Crème	Petite	Convexe	Régulier	Lisse	Opaque	Muqueuse



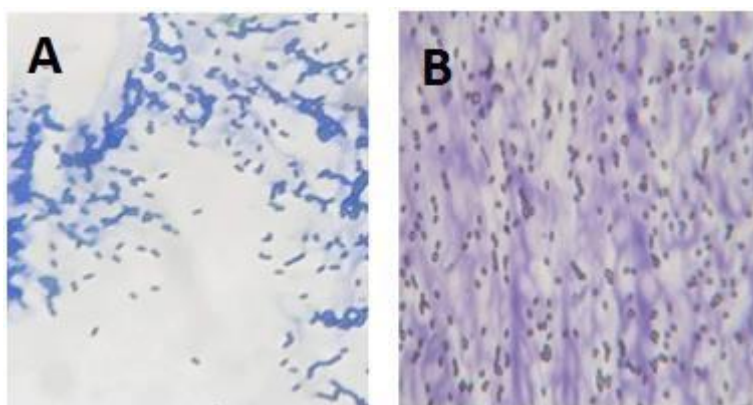
**Figure 33** Aspect macroscopique des isolats bactériens sélectionnés B1 et B15.

##### 4.5.2- Aspect microscopique

L'observation à l'état frais, après coloration simple au bleu de méthylène et coloration de Gram des cellules bactérienne sont permis de donner une idée sur la morphologie, la mobilité et la composition de leurs parois.



**Figure 34** Coloration de Gram des bactéries sélectionnées sous microscope A : B1, B : B15 (G X40).



**Figure 35** Coloration simple des bactéries sélectionnées sous microscope A : B1, B : B15 (GX40).

Les résultats présentés dans le tableau 9 résument les caractéristiques des isolats sélectionnés.

**Tableau 10** Caractères microscopiques des isolats bactériens (B1 et B15).

Isolats	Forme	Mobilité	Gram
B1	Bacille	Mobile	Gram +
B15	Bacille	Mobile	Gram +

## 4.6- Tests biochimiques

### 4.6.1- Test catalase

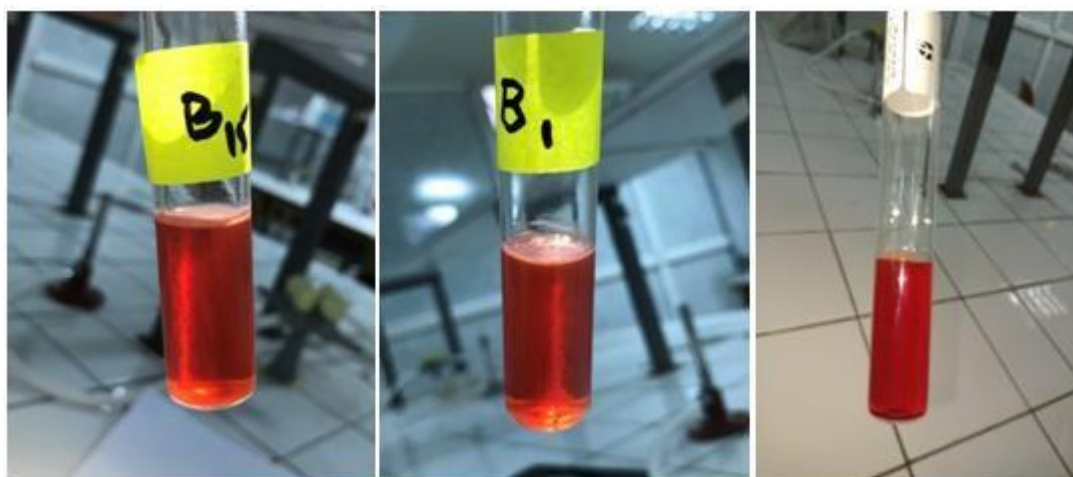
Le test de la catalase a montré que B1 et B15 sont catalase positive, car on observe une formation des bulles après le dépôt de peroxyde d'oxygène ( $H_2O_2$ ). Les résultats de ce test sont illustrés dans la figure 38.



**Figure 36** Résultats du test catalase des deux bactéries antagonistes B1 et B15 respectivement.

### 4.6.2- Test de mannitol mobilité

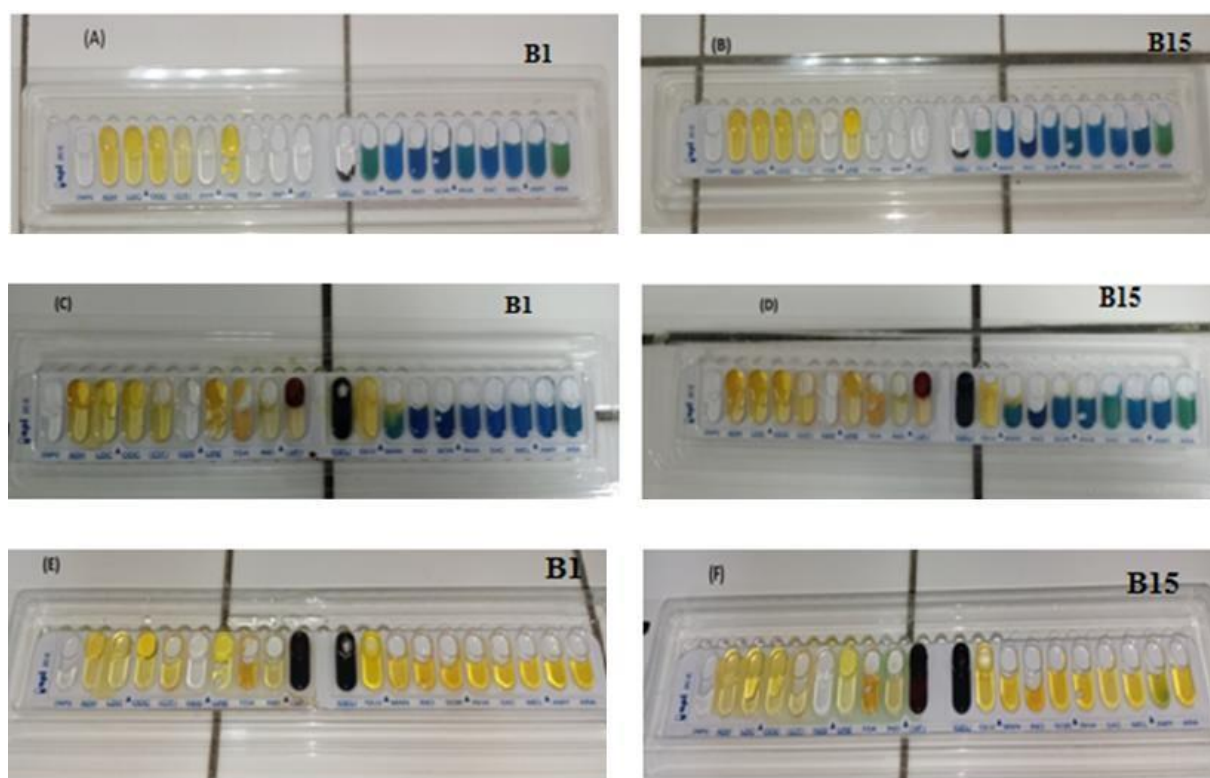
Le test du mannitol mobilité a dévoilé que les deux bactéries (B1 et B15) sont mobiles et sont mannitol négative car ils ne possèdent pas la capacité de fermenter le mannitol.



**Figure 37** Résultat du test mannitol mobilité des deux bactéries B15, B1 et le témoin.

### 4.6.3- La galerie Api 20 E

Ce test a été effectué selon la disponibilité de la galerie Api 20E et vue qu'elle a des tests biochimiques en commun avec API 50 CH spécifique pour les bactéries appartenant au genre *Bacillus*.



**Figure 38** Résultats d'Api 20E (A, B) témoin ; (C, D) résultats après 24h d'incubation à 30°C ; et (E, F) résultats après 48h d'incubation à 30°C.

Les résultats de lecture de la galerie API 20 E après l'incubation pendant 48 heures à 30°C sont présentés dans le tableau 10.

**Tableau 11** Résultats de la galerie Api20E après 48h d'incubation à 30°C des deux bactéries B1 et B15

N°	Test	Résultats	
		B1	B15
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 : D- mannitol	+	+
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	+	+

Les résultats de la galerie Api 20 E des deux bactéries B1 et B15 ont montré la capacité de fermenter le D-glucose, D-mannitol, Inositol, D–sorbitol, L–rhamnose, D-saccharose, D-melibiose, Amygdaline, L-arabinose, et fermenter le glucose par utilisation de la voie de butylène glycol. Ainsi, elles possèdent la gélatinase, tryptophane désaminase, et l'enzyme tryptophane pour la production d'indole.


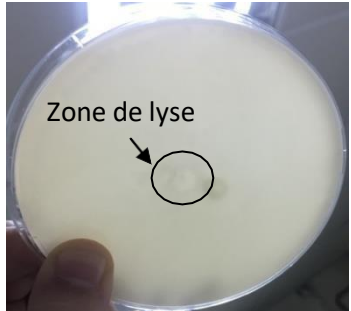




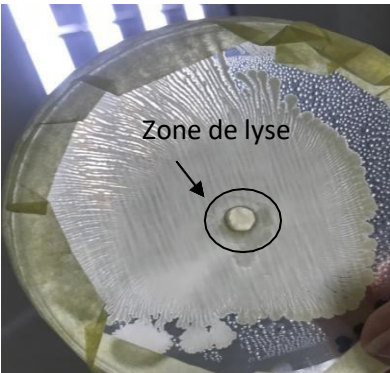

A partir de l'étude macroscopique et microscopique, test de thermorésistance et les tests biochimiques les isolats bactériens sélectionnés B1 et B15 sont *Bacillus sp1.* et *Bacillus sp2.* Respectivement.

#### **4.7- Test enzymatique**

Les résultats de ce test montrent la capacité des souches performantes à produire des enzymes nécessaires dégradant la paroi des cellules fongiques comme la protéase, la lipase, la chitinase et l'amylase (tableau 11).



**Tableau 12** Résultats de l'activité enzymatique des bactéries B1 et B15.

L'activité enzymatique	B1	B15
Activité protéasique	 <p>Zone de Lyse</p>	 <p>Zone de lyse</p>
L'activité chitinasique	 <p>Zone de Lyse violette</p>	 <p>Zone de Lyse violette</p>
L'activité amylase	 <p>Zone de lyse</p>	 <p>Zone de lyse</p>
L'activité lipase	 <p>Zone de lyse</p>	 <p>Zone de lyse</p>

Les activités enzymatiques illustrées dans le tableau 10 ont révélé par la détection des zones d'hydrolyse qui se caractérise par la formation d'un halo clair autour des disques de colonies.

La lecture des boites a montré les résultats suivants : Test protéasique des souches B1 et B15 : présence d'un halo clair autour de la culture due à l'hydrolyse de la caséine (test positif); l'activité chitinasique des souches B1 et B15 présence d'un halo clair indique l'hydrolyse de la chitine (test positif); le test amylase sur les souches B1 et B15 a montré un halo clair dû à l'hydrolyse de l'amidon par l'alpha amylase (test positif); le test lipasique sur les souches B1 et B15: présence d'un halo d'éclaircissement autour des colonies indique l'hydrolyse de tween 80 (test positif).

#### **4.8- Test de bio-contrôle**

Un test de bio-contrôle a été réalisé dans les conditions de pots sur des plantules de tomate (variété : Blacmine), pour confirmer que les souches sélectionnées (*Bacillus sp1.* et *Bacillus sp2.*) possèdent un effet protecteur contre les moisissures qui causent des maladies phytopathogènes.

**Tableau 13** Présentation de la taille, nombre de feuilles et les symptômes des plantules de tomates inoculé par *Bacillus sp1.* et *Bacillus sp 2.* et le témoin.

Variables	Souches		
	Témoin	<i>Bacillus sp1.</i>	<i>Bacillus sp 2.</i>
Taille des plantes	17,6	21,8	22
Nombre de feuilles par plante	62,6	95,8	69
Nombre de symptômes	13	6,2	6,4

Les résultats du traitement effectué par les souches sélectionnées *Bacillus sp 1.* et *Bacillus sp 2.* ont montré un effet positif sur la croissance des plantules saines de tomates (augmentation de la taille et le nombre de feuilles) par rapport au témoin. En effet, les meilleurs résultats ont été constatés par *Bacillus sp1.*

Dans le but de vérifier la capacité des souches bactériennes obtenues *Bacillus sp1.* et *Bacillus sp 2.* à inhiber la croissance mycélienne des agents phytopathogènes (*Pythium sp 1.*, *Pythium sp 2.*, *Alternaria sp.*, *Aspergillus sp1.*, *Aspergillus sp2.*) *in situ* un test de bio-contrôle a été effectué sur les plantules saines de tomate dans les conditions de pots, les résultats de l'évaluation de la sévérité des maladies, le nombre de feuille et la tailles des plantules obtenus après inoculation de 1 mois sont montrés dans le tableau 13.



Tableau 14 Effet du traitement sur des plantules de tomate (variété : blacmine) par les différentes souches (*Bacillus sp1*, *Bacillus sp2*) dans des conditions de pots après 1 mois d'inoculation par l'agent phytopathogène.

		Souches			
Variables	Taille des plantes	<i>Aspergillus sp 2</i>	17,75	103,5	5
		<i>Aspergillus sp 1</i>	17	75,5	41
		<i>Alternaria sp</i>	15,8	91	4,6
		<i>Pythium sp2</i>	14,6	83,6	4,6
		<i>Pythium sp1</i>	14,25	73	6,75
		<i>Bacillus sp2/ Aspergillus sp 2</i>	18,4	68,4	3,4
		<i>Bacillus sp2/ Aspergillus sp 1</i>	16,25	57,25	3,25
		<i>Bacillus sp1/ Alternaria sp</i>	18,2	58,4	5,6
		<i>Bacillus sp2/ Pythium sp2</i>	16,8	69	4,6
		<i>Bacillus sp2/ Pythium sp1</i>	17,6	60,8	3,4
		<i>Bacillus sp1/ Aspergillus sp 2</i>	16,5	44,5	10
		<i>Bacillus sp1/ Aspergillus sp 1</i>	16,76	80,2	3,4
		<i>Bacillus sp1/ Alternaria sp</i>	19,8	64	4,4
		<i>Bacillus sp1/ Pythium sp2</i>	19,6	75,6	8,8
		<i>Bacillus sp1 /Pythium sp1</i>	19	55,4	4,8
			Nombre de feuilles		
	Nombre de symptômes				

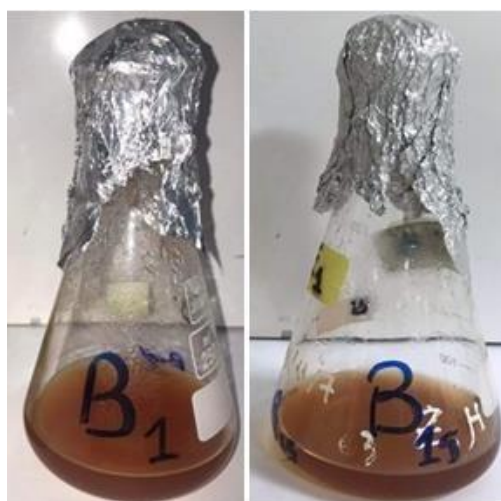
Après l'analyse des résultats, on constate que *Bacillus sp1* avait un effet positif sur l'augmentation de la taille sur les plantules infecté par *Pythium sp1* et *Pythium sp2* et *Alternaria sp* par rapport au témoin, par contre aucun effet n'a été constaté par rapport à l'augmentation du nombre de feuilles. En ce qui concerne l'effet protecteur contre les agents phytopathogènes inoculés, on observe que *Bacillus sp 1* avait un effet positif seulement sur les plantules infectées par *Aspergillus sp 1* où le nombre de symptômes a été diminuer jusqu'à 3,4 par rapport au témoin (41).

Ainsi, pour *Bacillus sp 2* avait un effet positif sur l'augmentation de la taille sur les plantules infecté par *Pythium sp1*, *Pythium sp2*, *Alternaria sp*, *Aspergillus sp2* par rapport au témoin. Par contre aucun effet n'a été constaté par rapport à l'augmentation du nombre de feuilles. Cependant pour la protection des plantules contre les agents phytopathogènes la bactérie *Bacillus sp 2* avait un effet positif sur la diminution de nombres de symptômes des plantules infecté par *Pythium sp1*, *Aspergillus sp 1* et *Aspergillus sp 2*. En effet le meilleur effet protecteur a été observé sur les plantules infecté par *Aspergillus sp 1*. Où le nombre de symptômes a été diminuer jusqu' à 3,25 par rapport au témoin (41).

D'après l'interprétions des résultats on conclut que *Bacillus sp 1* avait le meilleur effet sur la stimulation de croissance, par contre *Bacillus sp 2* est le meilleur protecteur des plantules de tomates contre les agents phytopathogènes.

#### **4.9-Fermentation en milieu alternatif à base de farine de noyaux de dattes**

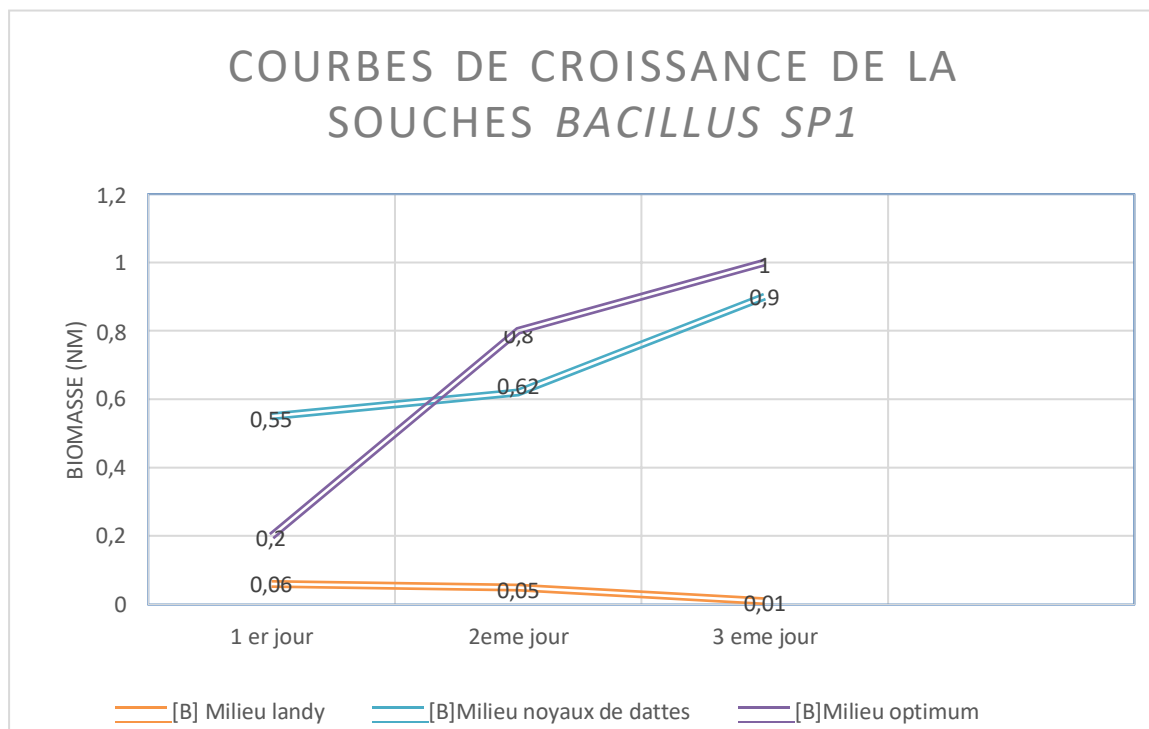
Une étude comparatif de fermentation a été effectuée afin de testé l'effet d'un nouveau milieu préparé à base de noyaux de dattes sur la production de biomasse et des métabolites des souches sélectionnées *Bacillus sp 1*. et *Bacillus sp 2*.



**Figure 39** Le développement des bactéries B1 et B15 sur milieu à base de farine de noyaux de dattes

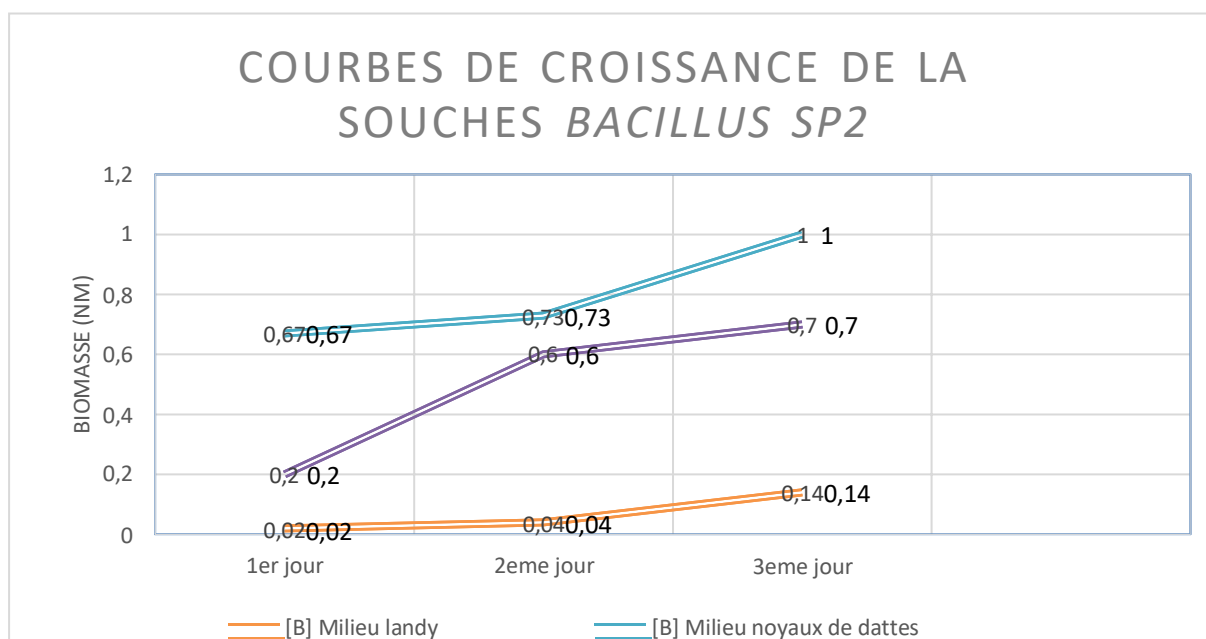
#### 4.9.1 – Evaluation de la biomasse

La mesure de la densité optique des cellules sélectionnées (*Bacillus sp1.* et *Bacillus sp2.*) chaque 24h pendant 72h a permis de donner les résultats suivants (figure 44) :



**Figure 40** Courbes de croissance des souches B1 sur différents milieux de culture pendant 72heures d’incubation à 30°C.

D’après l’analyse de La courbe de croissance on constate que la quantité de biomasse de *Bacillus sp1.* à la fin de fermentation sur différents milieux a été importante sur le milieu optimum (MO) et le milieu noyaux de dattes (MND) avec une valeur de 0,9 et 1 nm respectivement, alors qu’elle été moins importante sur milieu landy (Figure 46).



**Figure 41** Courbes de croissance des souches B15 sur différents milieux de culture pendant 72 heures d’incubation à 30°C.

En effet, nous avons constaté que la quantité de biomasse de *Bacillus sp2*. à la fin de fermentation sur différents milieux a été importante sur le milieu noyaux de dattes (MND) et le milieu optimum (MO) avec une valeur de 0,7 et 1 nm respectivement, alors qu’elle été moins importante sur milieu landy (Figure 41).

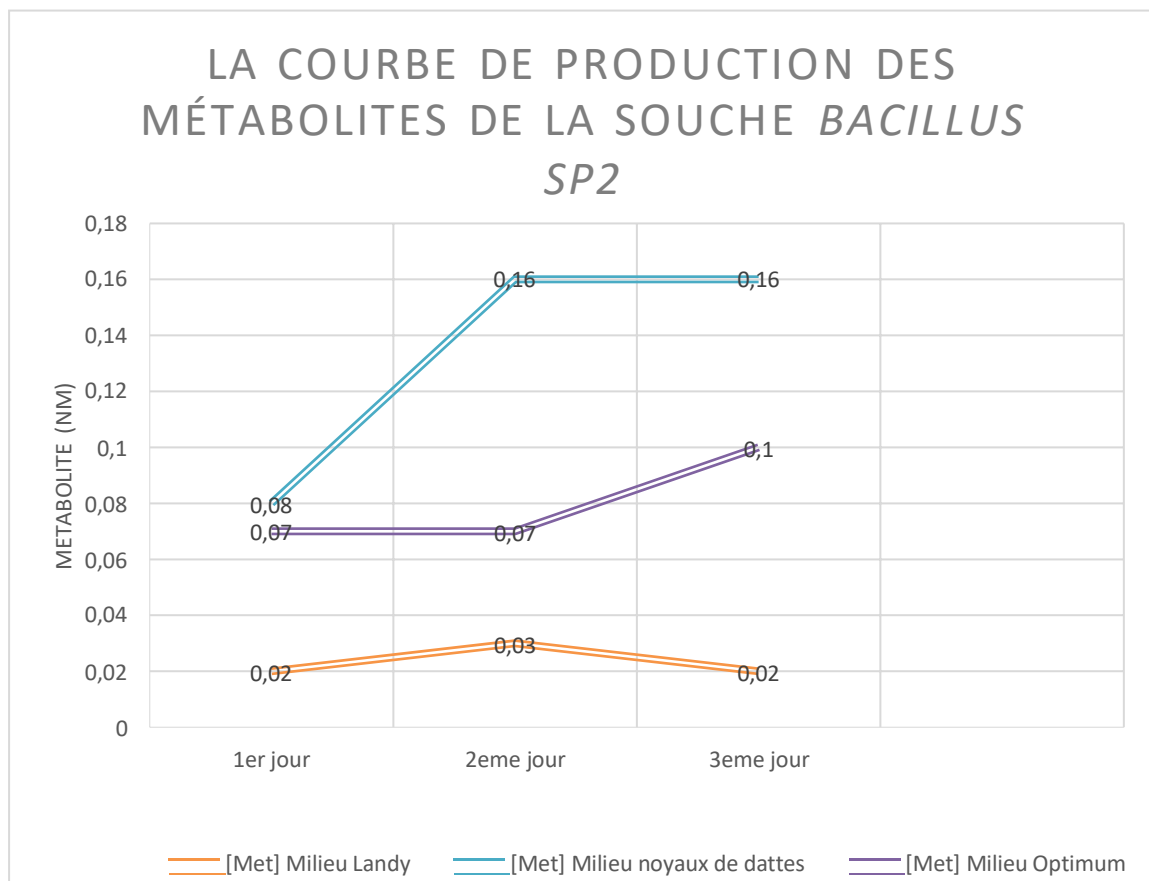
• **Détermination de la matière sèche**

Selon les valeurs illustrées dans le tableau ci-dessus, le meilleur résultat de la matière sèche pour *Bacillus sp1. et Bacillus sp2.* A été constaté dans les milieux (noyaux de dattes et optimum) où la meilleure valeur (0.087) a été observée dans le milieu noyaux de dattes pour *Bacillus sp1.*

**Tableau 15** Montre la détermination de la matière sèche.

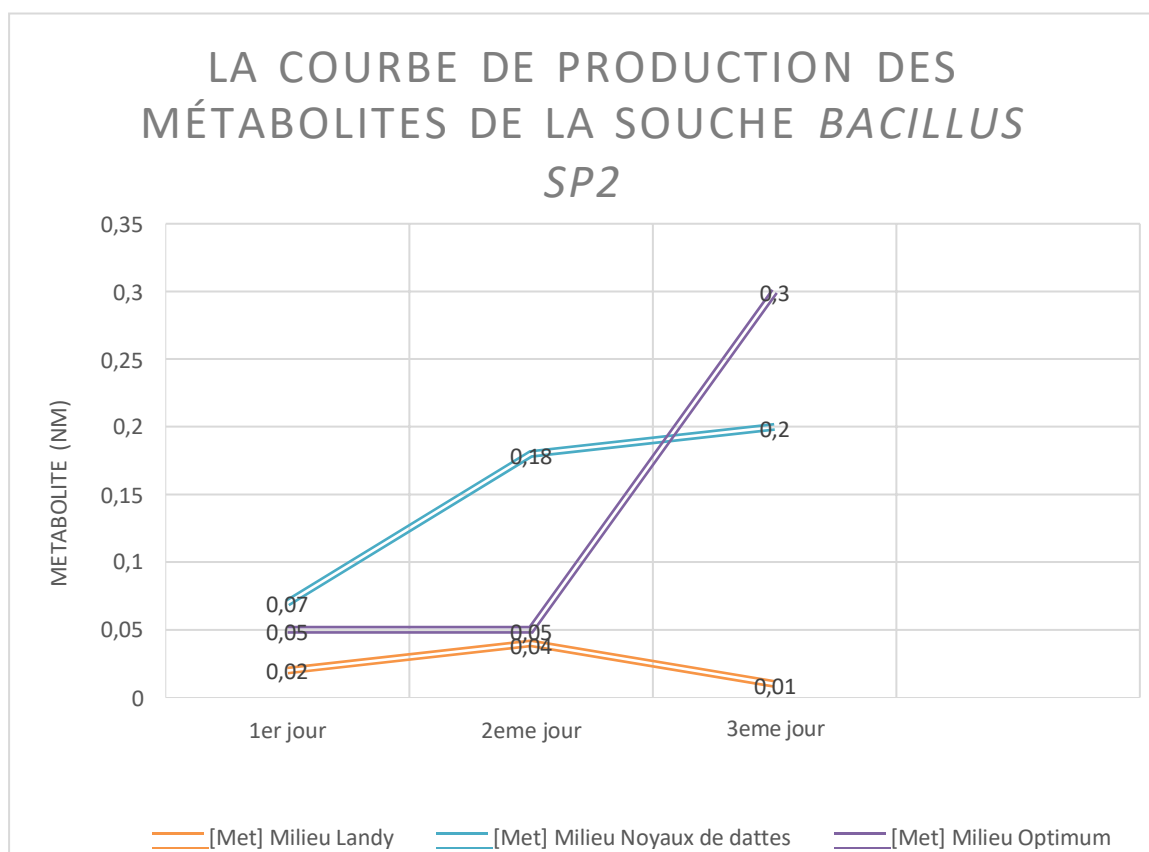
Souche	Milieux	Poids sec		Milieux	Poids sec
<i>Bacillus sp 1</i>	ML	0,005	<i>Bacillus sp 2.</i>	ML	0,05
	MO	0,011		MO	0,071
	MND	0,010		MND	0,087

4.9.2 – Analyse des métabolites



**Figure 42** La courbe de production des métabolites de la souche B1 sur différents milieux de culture pendant 72 heures d’incubation à 30°C.

Les résultats de ce test ont montré que quantité de métabolites de *Bacillus sp 1.* à la fin de fermentation sur différents milieux a été plus importante sur le milieu optimum (MO) et le milieu noyaux de dattes (MND) avec une valeur de 0,1et 0,16 nm respectivement, alors qu’elle été moins importante sur milieu landy (Figure 46).



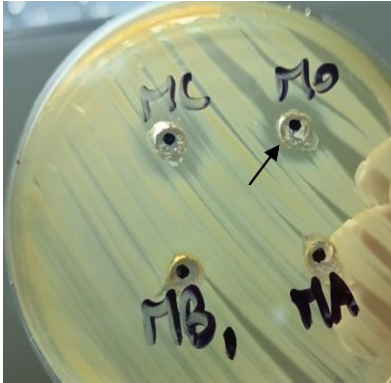

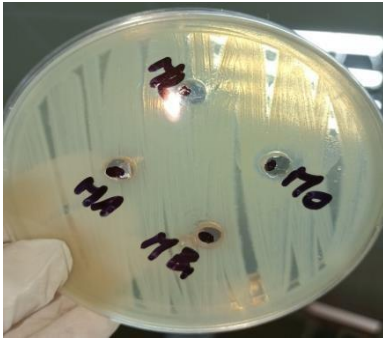

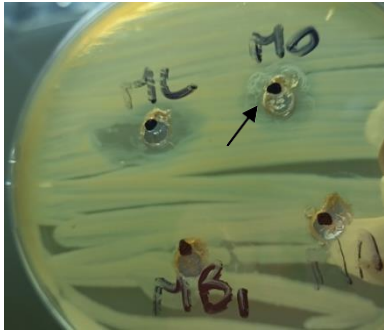
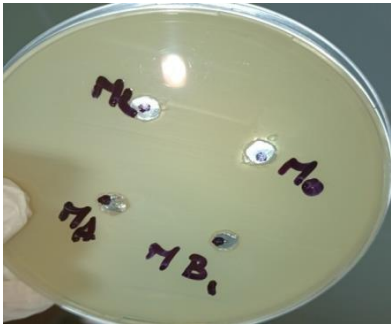
**Figure 43** la courbe de production des métabolites de la souche B15 sur différents milieux de culture pendant 72 heures d’incubation à 30°C.

En effet, nous avons constaté que la quantité des métabolites de *Bacillus sp2*. à la fin de fermentation sur différents milieux a été importante sur le milieu noyaux de dattes (MND) et le milieu optimum (MO) avec une valeur de 0,2 et 0,3 nm respectivement, alors qu’elle été moins importante sur milieu landy.

#### 4.10- Test antibactérien

L’effet antibactérien des souches sélectionnées *Bacillus sp1*. et *Bacillus sp2*. ont été testé vis à vis de 4 bactéries pathogènes en l’occurrence : *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853; *Escherichia coli* ATCC25722 ; *Enterococcus sp* ; *Bacillus subtilis* ATCC6633. Ont utilisant labiomasse et le filtrat obtenus à partir de milieu de référence Optimum. Les résultats du test antibactérien ont été illustrés après 24h d’incubation dans le tableau 16.

Tableau 16 Résultats du test antibactérien après 24h d'incubation.

Souches pathogènes	<i>Bacillus sp1.</i> B1	<i>Bacillus sp2.</i> B15
<i>Pseudomonas</i>		
<i>Escherichia coli</i>		
<i>Enterococcus</i>		
<i>Bacillus</i>		

Les bactéries *Bacillus sp 1.* et *Bacillus sp 2.* Ont développé une activité antibactérienne caractérisée par l'apparition d'une zone claire autour des puits contre les trois bactéries test (*Pseudomonas*, *Escherichia coli* et *Enterococcus*). Cependant pour la bactérie test *Bacillus* aucune inhibition n'a été observée par les deux bactéries sélectionnées.

**Tableau 17** Présentation de longueurs des zones d'inhibition des bactéries pathogènes par les bactéries sélectionnées *Bacillus sp1.* et *Bacillus sp1.*

Souche	Biomasse/ Métabolite	milieu	<i>Bacillus sp1</i> (B1)	<i>Bacillus sp2</i> (B15)
<i>Pseudomonas</i>	Biomasse	ML	3 mm	4 mm
		MO	3 mm	3 mm
		MND	/	/
	Métabolites	ML	3 mm	2 mm
		MO	3 mm	3 mm
		MND	1 mm	1 mm
<i>Escherichia coli</i>	Biomasse	ML	2 mm	/
		MO	7 mm	2 mm
		MND	4 mm	3 mm
	Métabolites	ML	2 mm	3 mm
		MO	/	4 mm
		MND	/	/
<i>Enterococcus</i>	Biomasse	ML	2 mm	4 mm
		MO	2 mm	2 mm
		MND	/	/
	Métabolites	ML	2 mm	2mm
		MO	2 mm	2 mm
		MND	/	/
<i>Bacillus</i>	Biomasse	ML	/	/
		MO	/	/
		MND	/	/
	Métabolites	ML	/	/
		MO	/	/
		MND	/	/



Des zones de lyse de taille différentes ont été mises en évidence dans le tableau 12. En effet, les longueurs des zones d'inhibition varient entre 1 et 7 mm, avec un meilleur effet d'inhibition de la souche *Bacillus sp1*. À un spectre d'activité plus important que *Bacillus sp2*

2. Cependant, *Bacillus sp1*. Avait un fort effet antibactérien avec une zone de lyse de 7mm vis-à-vis à la bactérie test *Escherichia coli*.

#### **4.11- Lyophilisation**

Après la fermentation de trois jours, la biomasse de deux bactéries testées a été lyophilisée et transformée en poudre à l'aide d'un lyophilisateur.

# *Discussion*

## 5- Discussion

L'intensification de la production agricole a eu lieu parallèlement à l'expansion de la population mondiale, au cours de XXe siècle. Cette intensification communément appelé « Révolution agricole » se caractérise principalement par l'utilisation intensive des pesticides chimiques (Cartillier, 1977).

L'utilisation irraisonnée de ces derniers a provoqué, dans certaines situations, des conséquences inattendues sur l'environnement et la santé humaine (Dallaire *et al.*, 2012). Ce qui a conduit à l'utilisation des méthodes alternatives d'origine naturelle telles que la lutte biologique qui est efficace, moins toxique, utilisable en serre, permet de diminuer les risques d'apparition de résistances aux produits chimiques et d'améliorer la qualité de vie et de la santé humaine (Lefort, 2010).

Le présent travail s'inscrit dans le cadre de la recherche de nouvelles souches antagonistes isolées à partir du sol de la zone de la rhizosphère, afin d'étudier leurs capacités antagonistes *in vitro* et *in situ* vis-à-vis les agents phytopathogènes isolés à partir des feuilles, des tiges et des racines de la pomme de terre, présentant plusieurs symptômes de maladies fongiques causés par différentes moisissures tel que : *Pythium sp.*, *Alternaria sp.* et *Aspergillus sp.*, dans la région de l'Harrouche de Skikda.

Dans cette optique, l'identification des agents phytopathogènes est basée sur l'observation macroscopique et microscopique. D'abord, les isolats phytopathogènes M1 et M2 utilisés ici présentent les symptômes de la pourriture aqueuse de pomme de terre, les caractéristiques macroscopiques de M1 montre que la couleur de la colonie est blanc cassé, de verso marron, une surface cotonneuse, et des reliefs surélevés, avec des bordures mycéliennes irrégulières. Alors que la souche M2 montre une couleur de colonie blanche, de verso beige, une surface cotonneuse, et des reliefs surélevés, avec des bordures mycéliennes irrégulières.

L'observation microscopique de l'isolat M1 montre la présence d'un mycélium cloisonné et ramifié. Alors que l'isolat M2 montre la présence des sporanges ovoïdes, et des extrémités très proéminentes appelées papilles.

Selon ces caractères macroscopiques et microscopiques, ces isolats ont été identifiés, en présomptive, comme *Pythium sp1* et *Pythium sp2*. Accessoirement, ces caractéristiques macroscopiques et microscopiques sont conformes à celles de Koffi *et al.* (2020).

Ensuite, l'isolat A1 présente les symptômes de l'Alternariose de pomme de terre (taches marronnes sous forme d'anneaux concentriques). Les caractéristiques macroscopiques de ce champignon montrent que la couleur de la colonie est marronne (recto, verso), une surface cotonneuse, et des reliefs surélevés, avec des bordures mycéliennes irrégulières.

L'observation microscopique de l'isolat A1 montre la présence des conidies de forme ovale, de couleur brune jaunâtre, avec 2 à 3 transeptas et 1-2 longisepta.

Accessoirement, les caractéristiques microscopiques de A1 sont en accord avec ceux de Sellal *et al.* (2012) qui ont montré que les conidies se forment en longueur, souvent branchées en chaînes ovoïdes ou elliptiques, de couleur pale à brun doré, lisses ou verruculeuses, transversales, généralement longitudinales ou obliques.

Selon ces caractères macroscopiques et microscopiques, cet isolat a été identifié, en présomptif, comme *Alternaria sp.* (Sellal *et al.*, 2012 ; Nounsi *et al.*, 2013).

Enfin, l'isolat A3 montre que la couleur de la colonie est rose et de verso beige, une surface poudreuse, et des reliefs plats, avec des bordures mycéliennes irrégulières. Alors que l'isolat A4 montre une colonie de couleur blanche jaunâtre et de verso beige une surface granuleuse, et des reliefs surélevés, avec des bordures mycéliennes irrégulières. L'observation microscopique de l'isolat A3 montre la présence d'une tête, un hyphe non sépté et des conidies rondes. Alors qu'A4 montre la présence d'un conidiophore lisse et des conidies globeuses, vertes.

Selon ces caractères macroscopiques et microscopiques, ces isolats ont été identifiés, en présomptif, comme *Aspergillus sp1 et Aspergillus sp2* (Sellal *et al.*, 2012).

La présence de ces moisissures phytopathogènes dans les différentes parties des plantes de la pomme de terre malades a été rapporté par plusieurs études, telle que Sellal *et al.* (2012), Aydi *et al.* (2013) et Nounsi *et al.* (2013).

L'application de cinq agents phytopathogènes étudiés sur des plantules saines de tomate pour réaliser le test de pathogénicité s'est déroulée avec réussite. Cette réussite est auparavant signalée dans le travail de Schmitthenner et Bhat (1994). Les symptômes des maladies phytopathogènes apparaissent après 20 jours d'inoculation des plantules de tomate par les souches fongiques. Les résultats obtenus après ré-isolement des agents phytopathogènes montrent que ces derniers ont pu infecter les plantules de tomate, causant, ainsi, des différents symptômes avec un degré de sévérité égale à 76% comparativement aux témoins.

Les symptômes sont essentiellement représentés par l'apparition des taches sur les feuilles. La couleur des feuilles atteintes vire vers le jaune, puis vers le brun et la feuille finit par tomber. Ces observations sont plus ou moins identiques à celles décrites par Nounsi *et al.* (2013) et Montfort et Rouxel. (1988).

La diversité des bactéries et des champignons dans les sols est très élevée, un seul gramme du sol pouvant contenir plusieurs milliers d'espèces fongiques et bactériennes (Schulz *et al.*, 2006). Ces derniers constituent une source écologique importante d'isolement des microorganismes résistants, ayant des caractéristiques particulières, cette particularité est due

aux exsudats racinaires et aux interactions diverses microbe-microbes et microbes-plantes, telles que la symbiose, prédation, parasitisme, antagonisme, ce qui augmente la chance de trouver des agents antagonistes à des potentialités importantes de bio contrôle (Dib *et al.*, 2009). Afin de lutter contre les maladies phytopathogènes, des agents antagonistes ont été isolés à partir du sol de la zone de la rhizosphère de pomme de terre au niveau de la région d' Ain Bouziane de Skikda.

Vingt isolats microbiens ont été testés pour leur activité antagoniste vis-à-vis cinq agents phytopathogènes isolés au paravent, après avoir réalisé un test antagoniste *in vitro* par la méthode de confrontation directe, les résultats obtenus ont révélé que seulement deux souches antagonistes (B1 et B15) avaient un effet inhibiteur avec des pourcentages d'inhibition variant entre (33% et 69%). Cependant, l'isolat B15 a développé le meilleur effet. L'étude de l'interaction des deux bactéries à effet inhibiteur (B1 et B15) a été effectuée sous microscope où on a pu constater un simple attachement de bactéries sur les hyphes, une formation de biofilm autour des hyphes avec une dégradation de ces derniers, des colonisations intracellulaires des hyphes, un rétrissement et déformations de spores. L'activité antagoniste investiguée dans ce travail peut être expliquée par le pouvoir de ces souches performantes à produire des substances antifongiques, capables de dégrader la paroi des champignons. (Tserkovniak *et al.*, 2009). Ce travail a été élaboré par plusieurs études telles que Melo et Full. (2000) et Raaijmakers *et al.* (2002).

Par la suite une étude morphologique a été réalisée pour identifier les isolats bactériens, avec des tests biochimiques. En effet, selon les caractères macroscopiques, microscopiques et les tests biochimiques, les isolats bactériens B1 et B15 ont été identifiés, en présomptive, comme *Bacillus sp1*. Et *Bacillus sp2*. (Ait Kaki *et al.*, 2013 ; Youcef ALI, 2014 ; Milet, 2017). De plus, La présence des bactéries du genre *Bacillus* dans la rhizosphère de diverses plantes a été investiguée dans plusieurs études, telle que de Abbo *et al.* (2012) et Ait kaki *et al.* (2013) qui ont isolé des souches de *Bacillus spp* à partir du sol de la rhizosphère pour les utiliser en tant qu'agents de lutte biologique.

Les souches bactériennes *Bacillus sp1*. et *Bacillus sp2*. Ont été utilisées pour effectués un test *in situ* sur des plantules de tomate dans des conditions de pots. En effet, la souche *Bacillus sp1*. A montré le meilleur effet de protection et de croissance de plantes de tomate (augmentation de nombre de feuille et stimulation de la taille) en comparaison avec le témoin. Concernant *Bacillus sp2.*, on a constaté aussi une amélioration remarquable de croissance de plantes.

De ce fait, les souches *Bacillus sp1.* et *Bacillus sp2.* Étudiées dans ce travail ont de performances de bio-contrôle et de stimulation intéressantes. Ce qui permet leurs utilisations comme agents de bio-contrôle dans le but d'augmenter le rendement des récoltes agricoles.

Les tests de l'activité enzymatique réalisés pour les souches sélectionnées *Bacillus sp1.* et *Bacillus sp2.* Ont montré que ces derniers ont la capacité de produire l'amylase, la lipase, la protéase et la chitinase. Des résultats similaires ont été élaborés par Ait Kaki et al. (2013), qui ont trouvé que plusieurs espèces de *Bacillus* ont montré des potentialités importantes dans la production d'amylase, protéase, cellulase et chitinase.

Une étude comparative de fermentation a été effectuée en utilisant trois milieux de culture : milieu Landy, optimum et un milieu alternatif à base de noyaux de dattes, ce dernier est utilisé pour la première fois dans ce travail dans le but d'améliorer la production de biomasse des souches sélectionnés *Bacillus sp1.* Et *Bacillus sp2.* En utilisant des matières premières disponibles et moins cher.

Les résultats de cette étude ont montré une production remarquable de la biomasse dans le milieu noyaux de dattes et le milieu optimum par les souches *Bacillus sp1.* Et *Bacillus sp2.*, alors qu'elle est moins importante dans le milieu Landy. Cela nous permet de dire que ce milieu peut remplacer le milieu optimum qui est un milieu de culture favorable pour la croissance de ces bactéries.

Aussi, la quantité des métabolites a été suivie durant cette fermentation où les résultats ont montré une production élevée sur milieu à base de noyaux de dattes et le milieu optimum par la souche *Bacillus sp1.* Par contre, elle est inférieure sur milieu Landy. Ces résultats ont été plus ou moins similaires à celles de (Sabah et al., 2007).

L'activité antibactérienne des deux souches sélectionnées (*Bacillus sp1.* et *Bacillus sp2.*) a été testée selon la méthode de Kaenhammer. (1983) vis-à-vis quatre bactéries à savoir : (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Entérocooccus sp* et *Bacillus subtilis* ATCC 6633). Les résultats ont montré que les souches sélectionnées sont actives contre les trois bactéries tests (*Pseudomonas*, *Escherichia coli* et *Entérocooccus*), en effet, le meilleur effet a été obtenu par la souche *Bacillus sp1.* Avec un diamètre de la zone d'inhibition de 7 mm. Cependant, aucune activité inhibitrice n'a été détectée pour la bactérie test *Bacillus*. Ces résultats ont été rapportés par plusieurs études telles que Diop et al. (2007) ; Millette et al. (2007).

*Conclusion et  
perspectives*

## 6- Conclusion

Ce travail se focalise sur la recherche des microorganismes développant une activité antimicrobienne contre les agents phytopathogènes de la pomme de terre, afin de les utiliser dans le domaine de bio-contrôle.

L'exploration des différents échantillons (feuilles, tiges et racines) prélevés à partir de la région d'El Harrouche de Skikda présentant des symptômes de maladies fongiques nous a permis d'isoler et d'identifier cinq agents phytopathogènes, en l'occurrence : *Pythium sp1.*, *Pythium sp2.*, *Alternaria sp.*, *Aspergillus sp1.* et *Aspergillus sp2.* En effet, le pouvoir pathogène de ces isolats fongiques a été testé sur des plantules saines de tomate où on a constaté un taux de sévérité égale à 76%. Ainsi, l'échantillonnage effectué à partir de la zone de la rhizosphère d'Ain Bouziane de Skikda, afin de sélectionner des souches qui pourront être efficaces dans la gestion des maladies phytopathogènes, a abouti à l'isolement de vingt isolats bactériens. Les résultats d'évaluation du pouvoir antagoniste ont montré que seulement deux isolats bactériens B1 et B15 avaient une activité antifongique sur les moisissures phytopathogènes obtenus auparavant. L'étude des caractéristiques morphologiques et biochimiques a montré que les souches bactériennes B1 et B15 appartiennent au genre *Bacillus*. En outre, les tests réalisés *in situ* dans des conditions de pots par les deux souches sélectionnées *Bacillus sp1.* et *Bacillus sp2.* sur des plantules saines de tomate ont montré des effets différents sur le contrôle de la sévérité des maladies provoquées par les agents phytopathogènes, où le meilleur effet a été constaté par la souche *Bacillus sp1.* Par ailleurs, l'étude de l'activité enzymatique a révélé le pouvoir des souches sélectionnées à produire les enzymes, en l'occurrence : l'amylase ; la lipase ; la protéase et la chitinase.

Dans le but de tester l'effet d'un nouveau milieu utilisé pour la première fois dans ce travail préparé à base de noyaux de dattes sur la production de biomasse et des métabolites des souches sélectionnées ; *Bacillus sp1.* et *Bacillus sp2.*, une étude comparative de fermentation entre ce dernier et deux milieux de référence à savoir ; milieu optimum et milieu Landy utilisés auparavant, a été réalisée où les résultats de cette étude ont montré une bonne production dans les deux milieux alternatif et optimum par rapport au milieu Landy. La détermination de l'effet antibactérien des souches sélectionnées a été testée vis-à-vis de quatre bactéries pathogènes (deux bactéries Gram négatives et deux bactéries Gram positives), a montré un effet inhibiteur qui varie entre 1 et 7mm contre trois bactéries tests (*Pseudomonas*



*aeruginosa* ATCC27853, *Escherichia coli* ATCC25722, *Enterococcus* sp, et *Bacillus subtilis* ATCC6633. Par contre, aucune activité n'a été constatée avec la bactérie test ; *Bacillus*.

Cependant, nous ne disposons pas encore d'informations suffisantes pour éprouver une utilisation efficace, performante et rationnée de ces bactéries, en tant que bio pesticides. De ce fait, plusieurs études complémentaires et approfondies doivent être réalisées, en l'occurrence :

- ✓ L'identification génétique des deux souches sélectionnées et des isolats fongiques.
- ✓ Tester l'efficacité des souches sélectionnés sur d'autres plantes maraichères pour élargir leur spectre d'utilisation et de déterminer leurs limites.
- ✓ Le développement de processus de fermentations par le passage à l'échelle pilote puis à l'échelle industriel en utilisant notre nouveau milieu de culture proposé après optimisation.
- ✓ La caractérisation et la purification des substances inhibitrices produites par les souches sélectionnées à savoir ; lipopeptides et autres métabolites intéressants.
- ✓ L'identification des molécules bioactifs.

# *Abstract*

## 7- Abstract

Potato (*Solanum tuberosum L.*) is a widely consumed world food, but it is affected by several diseases, especially fungal diseases. The present study was carried out on this plant in the framework of the search for a new strain producing antimicrobial substances that allow to exploit it through applications in various fields, including biological control.

Isolation and morphological identification of the phytopathogenic agent from leaves, stems and fruits of potato collected in the region of Harrouche (Wilaya of Skikda) showing symptoms of fungal diseases allowed to obtain 5 fungal strains namely: *Aspergillus sp1*, *Aspergillus sp2*, *Pythium sp1*, *Pythium sp2* and *Alternaria sp.* The pathogenicity test on healthy tomato seedlings was carried out by the fungal strains obtained, which resulted in the provocation of the typical diseases observed on potato samples with a severity equal to 76%.

The exploration of samples taken from the rhizosphere soil of the region of Ain Bouziane of skikda allowed to obtain twenty bacterial isolates, these isolates were tested for their antagonistic effect, where only two bacterial isolates B1 and B15 possess an antifungal effect against the phytopathogenic agents obtained previously, with inhibition rates that vary between 33 and 69%. However, the bacterium B15 developed the best inhibition effect.

Morphological identification and biochemical tests of the selected isolates showed that B1, B15 were identified as *Bacillus sp1.* and *Bacillus sp2.*

In situ tests carried out in pots on tomato showed different effects of the selected antagonistic agents, where *Bacillus sp2* developed the best effect considering the most studied parameters (disease severity, seedling size and number of leaves). This impact is due to the capacity of this strain to produce antifungal substances.

Enzyme activity tests revealed the ability of the selected strains to produce the enzymes, namely amylase, lipase, protease and chitinase.

In order to search for a new fermentation medium based on available and cheaper primary products, to improve the production of biomass and metabolites of the selected antagonistic strains, a comparative study was conducted between 2 reference media (Landy and optimum) already used before and a new alternative medium based on date kernel meal used for the first time in this work, the results of this study have showed a good production of biomass and metabolites in both media (alternative and optimum) compared to the Landy media.

The two selected bacterial strains *Bacillus sp1.* and *Bacillus sp2.* were tested for their antibacterial effect against *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Enterococcus sp* and *Bacillus subtilis* ATCC 6633. These bacteria are active against the three bacteria namely *Pseudomonas*, *Escherichia coli* and *Enterococcus* with an inhibition diameter that varies between 1 and 7 mm. However, no antibacterial activity was observed with the *Bacillus* test bacterium.

To preserve the biomass of the bacteria obtained after a three-day fermentation, they were freeze-dried and transformed into powder using a freeze-dryer.

Key words : Potato, *Bacillus sp.*, *Aspergillus sp.*, *Pythium sp.*, *Alternaria sp.*, rhizosphere, bio-Control.

ملخص

## 8-ملخص

البطاطس (*Solanum tuberosum L*). غذاء مستهلك على نطاق واسع في جميع أنحاء العالم، لكنها تعاني من عدة أمراض خاصة الأمراض الفطرية. أجريت الدراسة الحالية كجزء من البحث عن سلالة جديدة تنتج مواد مضادة للميكروبات تسمح باستغلالها من خلال تطبيقات في مختلف المجالات، بما في ذلك مجال مكافحة البيولوجية إن العزل والتعرف الشكلي لمسبب أمراض النبات من الأوراق والسيقان وثمار البطاطس المأخوذة من منطقة الحروش (ولاية سكيكدة) والتي تظهر عليها أعراض الأمراض الفطرية' أتاح الحصول على 5 عزلات فطرية وهي: *Aspergillus sp1*, *Aspergillus sp2*, *Pythium sp*, *Pythium sp2* و *Alternaria sp*. تم إجراء اختبار المرض على شتلات الطماطم السليمة بواسطة العزلات الفطرية تم الحصول عليها، مما أدى إلى إثارة الأمراض النموذجية الموجودة في عينات البطاطس بشدة تصل إلى 76%.

أتاح استكشاف العينات المأخوذة من تربة الجذور في منطقة عين بوزيان بولاية سكيكدة الحصول على عشرين عزلة بكتيرية ، تم اختبار هذه العزلات لتأثيرها المضاد، حيث وجدنا أن اثنتين فقط من العزلات البكتيرية B1 و B15 تمتلكان مواد مضادة للفطريات' التأثير المضاد للفطريات ضد مسببات الأمراض النباتية التي تم الحصول عليها سابقاً، حيث سجلت معدلات تثبيط تتراوح بين 33% و 69%. في حين أن البكتيريا B15 طورت أفضل تأثير للتثبيط.

أظهر التحديد المورفولوجي والاختبارات البيوكيميائية للعزلات المختارة أن B1 و B15 تم تحديدهما على أنهما *Bacillus sp1* و *Bacillus sp2*.

أظهرت الاختبارات الموضوعية التي أجريت في الأوعية على الطماطم تأثيرات مختلفة للمضادات المختارة، حيث طورت *Bacillus sp2* أفضل تأثير مع الأخذ بعين الاعتبار المعايير الأكثر دراسة (شدة المرض ، حجم الشتلات وعدد الأوراق). يرجع هذا التأثير إلى قدرة هذه السلالة على إنتاج مواد مضادة للفطريات.

كشفت اختبارات نشاط الإنزيم على قدرة السلالات المختارة على إنتاج الإنزيمات، وهي الأميلاز والليباز والبروتياز والكتيناز.

من أجل البحث عن وسط تخمير جديد يعتمد على المنتجات الأولية المتاحة والأقل تكلفة، لتحسين إنتاج الكتلة الحيوية ومستقلبات السلالات المضادة المختارة، أجريت دراسة مقارنة بين وسطين مرجعيين (Optimum و Landy) مستخدمين سابقاً. ووسط بديل جديد يعتمد على دقيق نوى التمر يستخدم لأول مرة في هذه الدراسة، أظهرت نتائج هذه الدراسة إنتاجاً جيداً للكتلة الحيوية والمستقلبات في الوسط الجد والوسط المرجعي (Optimum) مقارنةً بالوسط (landy). السلالتين البكتيريتين *Bacillus sp1* و *Bacillus sp2* المختارتين من أجل اختبار تأثيرهما المضاد للبكتيريا ضد *Escherichia coli* ATCC 25922 و *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 و *Enterococcus sp* و *Bacillus subtilis* ATCC 6633. وتنشط هذه البكتيريا ضد: (*Escherichia coli* و *Pseudomonas*) و *Enterococcus* ذات قطر تثبيط يختلف بين 1 و 7 ملم. بينما لم يلاحظ أي نشاط مضاد مع بكتيريا الاختبار *Bacillus*. للحفاظ على الكتلة الحيوية للبكتيريا التي تم الحصول عليها بعد تخمير لمدة ثلاثة أيام، تم تجفيفها وتحويلها إلى مسحوق باستخدام مجفف التجميد.

الكلمات المفتاحية : *Bacillus sp*، *Aspergillus sp*، *Pythium sp*، *Alternaria sp*، البطاطس، تربة الجذور، مكافحة الحيوية.

*Références  
bibliographiques*

## Références bibliographiques

1. Abbasher, A. A., Hess, D. E., Sauerborn, J. (1998). Fungal pathogens for biological control of *Striga hermonthica* on sorghum and pearl millet in West Africa. *African Crop Science Journal*, 6(2), 179-188.
2. Abbo A.S., Idris M.O., Hammad A.M. (2014). The Antifungal Effects of Four Tomato Rhizosphere *Bacillus* spp. against *Alternaria Alternata*. *International Journal of Science and Research*; ISSN (Online). 3 (7): 2319-7064.
3. Ait-Kaki A., Kacem-Chaouche N., Dehimat L, Milet A., Youcef-Ali M., Ongena M., Thonart P. (2013). Biocontrol and Plant Growth Promotion Characterization of *Bacillus* Species Isolated from *Calendula officinalis* Rhizosphere. *Indian. J. Microbiol.* doi:10.1007/s12088-013-0395-y.
4. Ariffin, H., Abdullah, N., Umi Kalsom, M. S., Shirai, Y., & Hassan, M. A. (2006). Production and characterization of cellulase by *Bacillus pumilus* EB3. *Int. J. Eng. Technol*, 3(1), 47-53.
5. Aydi, R., Hassine, M., Jabnoun-Khiareddine, H., Ben Jannet, H., Daami-Remadi, M. (2013). Valorisation des *Aspergillus* spp. comme agents de lutte biologique contre *Pythium* et optimisation de leur pouvoir antagoniste in vitro et in vivo. *Tunisian Journal of Medicinal Plants and Natural Products (TJMPNP)* [www.TJMPNP.com](http://www.TJMPNP.com) *Tunis. J. Med. Plants Nat. Prod*; 9(1): 70-82.
6. Bahous, M, Ouazzani Touhami, A., et Douira, Allal. (2008). Survie de quelques pathogènes fongiques sur les feuilles de riz conservées au laboratoire. *Bulletin de l'Institut Scientifique. French*, vol. 30, p. 13-18.
7. Barefoot S.F., Klaenhammer T.R., (1983). Detection and activity of lactacin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. *Appl Environ Microbiol*, 45(6) :1808-1815.
8. Benbrook C. M., Groth E., Halloran J. M., Hansen M. K. and Marquardt S. (2008). Pest management at the crossroads, Consumers Union, Yonkers.p272.
9. Benhacene Z., Messiad I et Slimane BL. (2016). Évaluation et taxonomie numérique des bactéries promotrices des plantes isolées de rhizosphère du *Capsicum annum* (Master dissertation, Université 8 Mai 1945 Guelma Université).



10. Bessaoud O et Lefki, (2018). Diagnostic du système de régulation de la pomme de terre en Algérie Rapport final provisoire. 46P.
11. Botton B, Bretion A, Fevre M, Gauthier S, Guy Ph, Larpent J.P, Reymond P, Sanglier J.J, Vayssier Y., et Veau P.,(1990) . Moisissures utiles et nuisibles.Importance industrielle. 2eEd. Masson. Paris, Milan, Barcelone et Mexico. 512.
12. Boumlik M, (1995). Systématique des spermaphytes. Edition Office des Publications Universitaires. Ben AKnoun (Alger). 80P.
13. Camille, D. (2007). Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyse ou de contrôle sanitaire. Edition Lavoisier. P 128-129.
14. Campbell R., Greaves M. P. (1990). Anatomy and community structure of the rhizosphere. In: the rhizosphere. Lynch I. M. (Eds). Wiley Series in Ecological and Applied Microbiology. 11-34.
15. Capkin E., Altinok I. et Karahan S. (2006). Water quality and fish size affect toxicity of endosulfan, an organochlorine pesticide, to rainbow trout. Chemosphere. 64: 1793-1800.
16. Carrim A. J. I., Barbosa E. C., Gonçalves V. J. D., (2006), enzymatic activity of endophytic bacterial isolates of Jacaranda decurrens Cham. (Carobinha-do-campo), Brazilian Archives of Biology and Technology, 49(3), p. 353-359.
17. Cartillier M. (1977). La révolution verte en Inde et le rôle des petites industries : le cas des pompes d'irrigation. *Tiers-Monde*. 70 : 397-412.
18. Champion R., Ray NalG., (2009). La carie commune du blé : une revenante. phytona. la défense des végétaux .N450.p.12-20.
19. Chehat, Agronomie Info., (2019)- Economie de la pomme de terre. Disponible sur : <https://agronomie.info/fr/économie-de-la-pomme-de-terre>
20. Cindy Dallaire, (2008). agronome-phytopathologiste Direction de l'innovation scientifique et technologique, LES AGENTS PATHOGÈNES (STREPTOMYCES ET SPONGOSPORA) RESPONSABLES DES GALES QUE L'ON RETROUVE CHEZ LA POMME DE TERRE. <https://www.agrireseau.net/lab/documents/spongo%20vs%20strepto.pdf>
21. Corbaz R. (2003). Principe de phytopathologie et de lutte contre les maladies des plantes. Presse polytechniques et universitaires romandes.
22. Dallaire R. G., Mukle F., Rouget P., Kadhel H., Bataille L., Guldner S., Seurin V.,Chajes.,C., Monfort O., Boucher J. P., Thome S., Jacobsen W., Multigner L et CordierS., (2012).Cognitive, visual, and motor development of month- old Guadeloupe aninfant exposed to chlordécone. Environmental Research. 118: 79:85.

23. 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.
24. Diop Bakar M., Dubois-Dauphin R., Tine E., Ngom A., Destain J., Thonart P., (2007). Bacteriocin producers from traditional food products., *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, 11(4): 275-281.
25. - Djellout H., Mekheldi D., Belkacem KK., Raio A et Krimi Z. (2019). Evaluation de potentiel de souche antagoniste de *Bacillus* spp. et de *pseudomonas* spp. Dans le contrôle d'agrobacterium spp. Pathogène impliqué dans la maladie de galle de collet. *Revue Agrobiologia* ; 9(1): 1267-1283.
26. FAO, (2008). (Food and Agriculture Organization of the United Nations).
27. FAOSTAT., (2015)- Food and Agriculture Organisation, Annuaire statistique de la FAO.
28. FAOSTAT. (2018). Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO), Rome, base de données FAOSTAT; Fonds monétaire international (FMI), Washington, D.C, base de données, Statistiques financières internationales, base de données du Bulletin mensuel de statistiques.
29. FAOSTAT., (2019)- Food and Agriculture Organisation, Annuaire statistique de la FAO.
30. Frenry J., Renard R. P., (2007), Précis de bactériologie clinique, 2ème édition, paris, p.1764.
31. Ghitri I. (2018).Caractérisation du potentiel PGP de la flore *Bacillus cereus* isolée du sol. (Master dissertation, Université de Tlemcen).
32. Gopinath S. C. B., Periasamy Anbu M. K., Arshad M. D., Thangavel L., Voon C. H., Hashim U., Chinni S. V., (2017), *Biotechnological Processes in Microbial Amylase Production: a review*, *BioMed Research International*, pages 9.
33. Guiraud, J.P. (1998). *Microbiologie alimentaire*. Dunod, Paris. P: 310-321.
34. Hanemian M., (2012). Rôle de la protéine CLV1 dans la sensibilité d'*Arabidopsisthaliana* à la bactérie phytopathogène *Ralstonia solanacearum*. Thèse de Doctorat en Interactions Plantes-Microorganismes. L'Université Toulouse III - Paul Sabatier. p 190.
35. Hariprasad, P., & Niranjana, S. R. (2009). Isolation and characterization of phosphate solubilizing rhizobacteria to improve plant health of tomato. *Plant and soil*, 316(1), 13-24.
36. Harrigan, W.F; Mccance, M.E. (1976). *Laboratory methods in food and dairy microbiology*. Academic press. London. P: 21-277.

37. Harwood C.R., Wipat A. (1996). Sequencing and functional analysis of the genome of *Bacillus subtilis* strain 168. *FEBS Letters*.389:84-87.
38. Heiny, D. K. et McIntyre, G.A. (1983). *ilelminthosporium solani* Dur. & Mont, development on potato periderm. *American Potato Journal* 60: 773-789.
39. Helluy S., et Holmes J.C., (2005). Parasitic manipulation: further considerations. *Behav.Processes* .68, p185-99.
40. Houidi H., Ahmadi I., (2007). Contribution à l'étude de l'effet de la fertilisation azotée-potassique sur pomme de terre (*Solanum tuberosum* L. var CONDOR) dans la région du Souf.
41. Jan W. Henfling., (1979).Centre International de la Pomme de terre. La pomme de terre; maladies et nematodes., Lima, Pirou. 69 pp.137pages.
42. Kerr J, (2014). Plants de pomme de terre Guide de la CEE-ONU sur les maladies, parasites et défauts des plants de pomme de terre. New York et Genève.108p.
43. Khakipour N., Khavazi K., Mojallali H., Pazira E et Asadirahmani H. Production of auxin hormone by fluorescent pseudomonas. *Am Eurasian J Agric Environ Sci*. 2008; 4(6), 687-692.
44. Koffi Ahébé Marie Hélène, YAH N'Guéttia Marie, KOFFI N'Dodo Bony Clovis, KOFFI Charlbert Yao, <sup>5</sup>ATTA Taky Hortense Diallo. (2020). Symptomatologie de la flore fongique infectant les feuilles d'accessions d'*Arachis hypogaea* L.,(Fabaceae) provenant de Vavoua (centre-ouest) et Séguéla (nord-ouest) de la Côte d'Ivoire. *Journal of Animal & Plant Sciences (J.Anim.Plant Sci*. ISSN 2071-7024). Vol.46 (2): 8240-8255 <https://doi.org/10.35759/JAnmPlSci.v46-2.7>
45. Kumar S, Srivastava K. (2013). Screening of tomato genotypes against early blight under field condition. *the bioscan. an international quarterly journal of life sciences*. 8 (1): 189-193.
46. Larpent, J. P. Larpent-Gourgaud. (1985). *Éléments de microbiologie*. Collection Enseignement des sciences, Ed Hermann, Paris, p. 146.
47. 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.
48. Lefort F., (2010). Lutte biologique et lutte microbiologique : des concepts anciens pour des méthodes de lutte modernes. Haute Ecole de Paysage d'ingénierie et d'architecture. Genève.

49. Lepoivre P., (2003). Phytopathologie. De Boeck les presses agronomiques de Gembloux, p 432.
50. Lollo, R., Maharaih, D., Görgens, J., Gardiner, N. (2010). A downstream process for production of a viable and stable *Bacillus cereus* aquaculture biological agent. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 86: 499-508.
51. Madigan M., Martinko J. (2007). *Biologie des microorganismes*, (11th edition) Pearson education. France.
52. Maufras, (2001). The role of the cropping method in the elimination of hazardous fungicides (*Tilletia caries*). Mémoire d'ingénieur. IST.univ.Tebessa. p70.
53. - Mazoyer M, Aubineau M, Bermond A, Bougler J, Bertrand N et Roger-Estrade J, (2002). Larousse Agricole 4 eme Edition, Ed. Mathilde Majorel assistée de Nora Schott Thierry, 766p.
54. Melero-Vara, Blanco-Lopez, M.A Bejarano-Alcazar. (2013). the control of cotton by means of soil solarization and tolerant cultivars in southern Spain. *Plantpatho*, 44 p 250-260.
55. Millette M, Dupont C, Archambault D, Lacroix M., (2007). Partial characterization of bacteriocins produced by human *Lactococcus lactis* and *Pediococcus acidilactici* isolate *Journal of Applied Microbiology*., 102(1): 274-282.
56. Moenne-locco, Powell J., Higgins P., McCarthy J., O'Gara F. (1998). An investigation of the impact of biocontrol *Pseudomonas fluorescens* F113 on the growth of sugar beet and the performance of subsequent clover- *Rhizobium* symbiosis. *Applied Soil Ecology*. 7: 225-237.
57. Montfort, F., & Rouxel, F. (1988). La maladie de la "tache" de la carotte due à *Pythium violae* Chesters et Hickman: données symptomatologiques et étiologiques. *Agronomie*, 8(8), 701-706.
58. Moulen GF., (2013). *Basic Technics in Ecological Farming/Techniques de base en agriculture Biologique/Le Maintien de la Fertilité des Sols*. 128pp.
59. Muzzarelli, R.A.A. (1999) *Analytical Biochemistry and Clinical Significance of N-Acetyl-β-D-Glucosaminidase and Related Enzymes*. In: Jollès, P. and Muzzarelli, R.A.A., Eds., *Chitin and Chitinases*, Birkhauser Verlag, Basel, 235-247.
60. Nasraoui B., (2006). *Les champignons parasites des plantes cultivées, biologie, systématique, pathologie, maladies*. Centre de publication universitaire, Tunis. p 456.

61. Ngoyi *et al.* (2020). Effect of organic amendments on growth and yield of potato (*Solanum tuberosum* L.) on soil degraded in Kabinda area, Democratic Republic of Congo. / *Int. J. Biol. Chem. Sci.* 14(5): 1812-1819, 2020.
62. Nihorimbere V, Pascal K, Ernest S. (2013). Isolation of *Bacillus* strains from the rhizosphere of Tomato and their in vitro antagonistic effects against phytopathogenic fungi. *Glo. Adv. Res. J. Microbiol.* 3(2): 065-071.
63. Nounsi, A., El Asri, A., Touhami, A. O., Benkirane, R., & Douira, A. (2013). Sur l'origine fongique des galles observées chez les Eucalyptus. *Journal of Applied Biosciences*, 62, 4665-4673.
64. Oswaldo T., (2010). Hommage à la pomme de terre. Haute école de santé de Genève, 11p.
65. Polese J-M, (2006). La culture des pommes de terre. Slovaquie, 96p.
66. Quéneá K. (2004). Étude structurale et dynamique des fractions lipidiques et organiques réfractaires de sols d'une chronoséquence forêt/maïs (Cestas, sud-ouest de la France) (Doctoral dissertation, Université de Paris 6 France).
67. Raaijmakers, J. M., M. Vlami et J. T. de Souza. (2002). « Antibiotic production by bacterial biocontrol agents ». *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology* 81 (1-4) : 537–547.
68. Rachel C., (1962). Printemps silencieux (Boston : Houghton Mifflin, Paris, Plon.
69. Rajnchapel M. J., (1987)- *la pomme de terre fait peau neuve*. Biofutur, Pp. 25-33.
70. Relyea R. A., (2009). A cocktail of contaminants: How mixtures of pesticides at low concentrations affect aquatic communities. *Oecologia.* (2): p 363-376.
71. Ramnath L., Sithole B., Govindena R., (2017), Identification of lipolytic enzymes isolated from bacteria indigenous to Eucalyptus wood species for application in the pulping industry, *Biotechnology Reports*, 15: 114-124.
72. Richard C. & Boivin G. (1994). Alternariose (maladie des taches brunes) de la pomme de terre. Dans *Maladies et Ravageurs des Cultures Légumières au Canada*. La Société Canadienne de Phytopathologie et la Société d'Entomologie du Canada, Canada. p. 255. (<http://phytopath.ca/wp-content/uploads/2014/10/MRCLC/ch16-pomme-de-terre.pdf>)
73. Robert Platt., (2008). Agriculture and Agri-Food Canada, 440, University Avenue, C1A 4N6 Charlottetown, Canada <plath@agr.gc.ca Cahiers Agricultures vol. 17, n° 4, juillet-août.
74. Rodriguez, D. A., Secor, G. A., Gudmestad, N. C. et Grafton, K. (1995). Screening tuber-bearing *Solanum* species for résistance to *Helminthosporium solani*. *American Potato Journal* 72: 669-679.

75. Rousselle P, Robert Y. et Grosnier J. C, (1996). La pomme de terre production, amélioration, ennemis, maladies et utilisation. INRA, Paris, 607P.
76. Saadoun, I. et Al-momani, F. (1997). Studies on soil streptomycetes from Jordan. *Actinomycetes*, vol. 8, p. 42-48.
77. Sabah, A. A. Jassim, A. Naja, A. (2007). In vitro Evaluation of the Activity of an Extract of Date Palm (*Phoenix dactylifera*, L.) Pits on a Pseudomons Phage, *ECAM*, p: 1-6.
78. Sawyer R, (1987). La pomme de terre –Bulletin d'information technique-Centre international de la pomme de terre- Pérou, pp : 33-102.
79. Schmitthenner, A.F., et Bhat, R.G. (1994). Useful Methods for Studying Phytophthora in Laboratory. Ohio Agriculture Research and Development Center. Special Circular 143. 10p.
80. Schulz, B. J. E., C. J. C. Boyle et T. N. Sieber. (2006). Microbial Root Endophytes. Édité par B. J. E. Schulz, C. J. C. Boyle et T. N. Sieber. 9. Springer Berlin Heidelberg.
81. Seldin, L., van Elsas, J.D., Penido, E.G.C. (1983). *Bacillus* nitrogens fixers from Brazilian soils. *Plant Soil*.70: 243-255.
82. Sellal, Z., Dahmani, J., Benkirane, R., Touhami, A. O., & Douira, A. (2012). Etude de la mycoflore associée à *Pyrus mamorensis* Trabut, arbre endémique de la forêt de la Mamora (Maroc). *Revue Marocaine de Protection des Plantes*, N° 3: 71-86.
83. Si Amar H., (2017). Application des bacilles thermophiles dans la lutte biologique. Mémoire de Master en Microbiologie Appliquée. L'université de Tlemcen. p43.
84. Singleton P. (2005). Bactériologie pour la médecine, la biologie et les biotechnologies, (6th edn) DUNOD. Paris.
85. Soltner D, (2005). Les grandes productions végétales. Phytotechnie spéciale. 20 éme Edition. 480p.
86. Spooner, D.M. et Hettterscheid, W.L.A. (2006). Origins, Evolution, and Group Classification of Cultivated Potatos. In Darwin's Harvest : New Approaches to the Origins, Evolution, and Conservation of Crops. T. J.Motley, N.Zerega, and H.Cross (eds). pp. 285-307. ColumbiaUniversity Press. New York.
87. Tserkovniak L.S., Roi A.O., Kurdysh I.K. (2009). Synthesis of amino acids of *Bacillus subtilis* IMV V-7023 in the medium with glycerophosphates. *Mikrobiol. Z.* 71: 218-232.
88. UNPT. (2009). Union Nationale de Production de la Pomme de Terre : production mondiale.

### ***Références bibliographiques***

---

- 89.** Westover K.M., Kennedy A.C., Kelley S.E. (1997). Patterns of rhizosphere microbial community structure associated with Co-occurring plant species. *Journal of Ecology*. 85: 563-873.
- 90.** Zitter, T. A. et Loria, R. (2007). Détection of Potato Tuber Diseases & Defects. [http://vegetablemdonline.ppath.cornell.edu/factsheets/Potato\\_Detection.htm](http://vegetablemdonline.ppath.cornell.edu/factsheets/Potato_Detection.htm).



# *Annexe*

# Annexe 1

## 1- Milieux de culture

### 1.1-Milieu PDA (Potato Dextrose Agar)

Laver et couper en petits cubes 200g de pommes de terre non pelées. Les mettre dans un litre d'eau distillée et porter à l'ébullition pendant une heure. Ecraser, filtrer et compléter un litre.

Composition du milieu finale :

Extrait de pomme de terre 1000ml

Glucose 20g

Agar 15g

Stériliser 30 minutes à 110°C (Larpen, 1997)

### 1.2-Milieu GN Gélose nutritive

Gélose nutritive (GN) ou gélose ordinaire, est un milieu d'isolement non-sélectif dont la

Composition chimique théorique en g/L d'eau purifiée est :

Peptone 10

Extrait de viande 5

Chlorure de sodium 5

Gélose 15

PH 7.2, autoclaver 15 minutes à 120°C (Guiraud, 1998).

### 1.3-Gélose Sabouraud

La gélose Sabouraud est un milieu recommandé pour la culture des champignons. La

composition chimique théorique de ce milieu en g/L d'eau purifiée est :

Peptone de viande (bovin ou porcin) 3

Peptone de caséine (bovin) 3

Peptone de soja 3

Extrait de levure 2

Extrait de malt 1

Glucose 19

Phosphate monopotassique 0.5

Phosphate disodique 0.5

Agar 13

Le PH est de 6.4. La présence de trois peptones et du glucose, ainsi que le pH acide du milieu favorisent la croissance des levures et des moisissures (Delarras, 2007).

#### **1.4- Milieu protéase (g/l)**

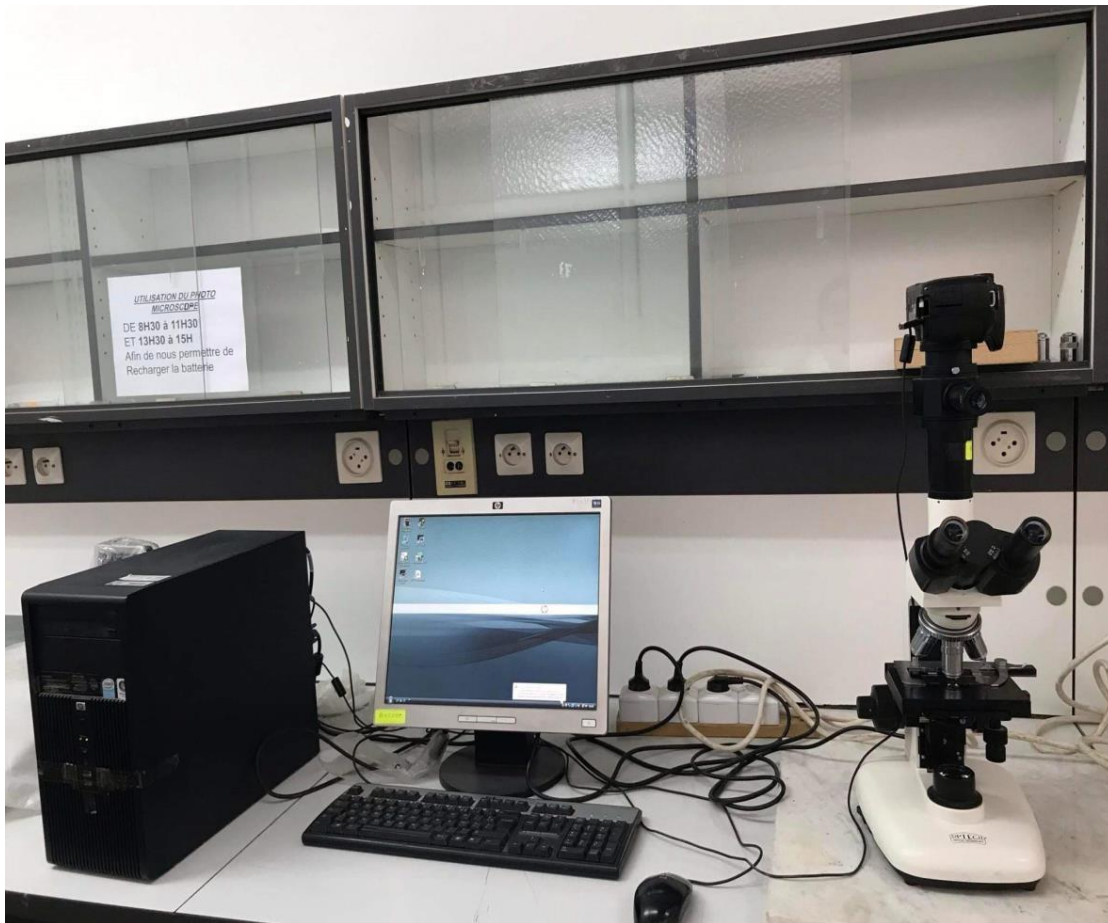
Poudre du lait	28
Peptone de caséine	5
Extrait de levure	2.5
Dextrose	1
Agar	15

#### **1.5- Milieu optimum**

Saccharose	20
Peptone	30
Extrait de levure	7
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,9
Solution d'oligoéléments: (mg.l-1)	
CuSO <sub>4</sub>	0,001
FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,005
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>	0,004
KI	0,002
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,014
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,01
Acide citrique	10
Solution de Mn/Mg : (mg.l-1)	
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	3,6
MgSO <sub>4</sub>	450



























## Annexe 2

### 2 – Microscope à camera



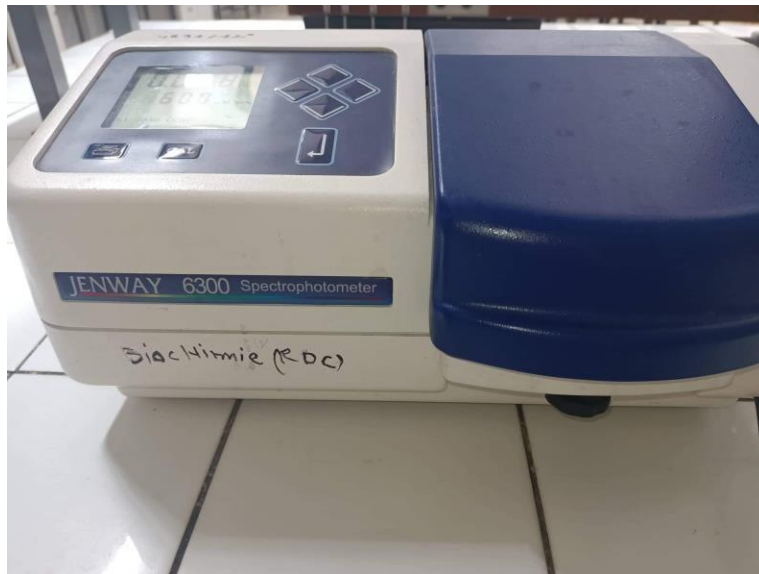
## Annexe 3

### 3- Tableau de lecture de la galerie Api 20<sup>E</sup>

TABLEAU DE LECTURE DE LA GALERIE MINIATURISÉE API 20E						
Microtubule	Substrat :	Caractère recherché :	Révélateur	Lecture directe ou indirecte Test (si nécessaire)	Résultat -	Résultat +
ONPG	ONPG = Ortho-Nitro-Phényl-Galactoside	Béta galactosidase		Lecture directe		
ADH LDC ODC	Arginine Lysine Ornithine	Arginine Dihydrolase Lysine Décarboxylase Ornithine Décarboxylase	Rouge de Phénol	Lecture directe		
(CIT)	Citrate	Utilisation du citrate	BBT	Lecture directe		
H <sub>2</sub> S	Thiosulfate de sodium	Production d'H <sub>2</sub> S		Lecture directe		
URÉ	Urée	Uréase	Rouge de Phénol	Lecture directe		 
TDA	Tryptophane	Tryptophane désaminase		<b>Lecture indirecte</b> Ajouter une goutte de réactif chlorure de fer III		
IND	Tryptophane	Tryptophanase ou production d'indole		<b>Lecture indirecte</b> Ajouter une goutte de réactif Kovacs	 	 
(VP)	Pyruvate de sodium	production d'acétoïne (3-hydroxybutanone)		<b>Lecture indirecte</b> Ajouter 1 goutte de VP1 et VP2 Attendre 10 minutes		 
(GEL)	Gélatine	gélatinase		Lecture directe		
GLU à ARA = zymogramme	Substrat carboné (glucide)	Utilisation de substrats carbonés (glucides)	BBT	Lecture directe		
NO <sub>2</sub> /N <sub>2</sub>	Nitrates (NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )	Nitrate réductase		<b>Lecture indirecte</b> Ajouter 1 goutte de NIT1 et NIT2 et zinc éventuellement		

## Annexe 4

### 4- Spectrophotomètre



## Annexe 5

### 5 – Lyophilisateur



Année universitaire : 2021-2022

Présenté par : BOUDERSA RANIA

BOURAS AYA MARWA

EL KRIMI RAHMA

## Recherche de nouvelle souche productrice de substances antimicrobiennes à partir du sol de la zone de la rhizosphère

Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master en Mycologie et Biotechnologie Fongique

### Résumé

La pomme de terre (*Solanum tuberosum L.*) est un aliment mondial largement consommé, mais elle est atteinte de plusieurs maladies en particulier les maladies fongiques. La présente étude a été effectuée sur cette plante dans le cadre de la recherche d'une nouvelle souche productrice des substances antimicrobiennes qui permettent de l'exploiter à travers des applications dans divers domaines, y compris dans le domaine du contrôle biologique. L'isolement et l'identification morphologique de l'agent phytopathogène à partir de feuilles, tiges et fruits de pomme de terre prélevés au niveau de la région d'El Harrouche (Wilaya de Skikda) qui présentent des symptômes de maladies fongiques ont permis d'obtenir 5 isolats fongiques, en l'occurrence : *Aspergillus sp1.*, *Aspergillus sp2.*, *Pythium sp1.*, *Pythium sp2.* et *Alternaria sp.* Le test de pathogénicité sur des plantules saines de tomate a été effectué par les souches fongiques obtenues, cela a abouti à la provocation des maladies typiques constatées sur les échantillons de pomme de terre avec une sévérité égale à 76%. L'exploration des échantillons prélevés provenant du sol de la rhizosphère de la région d'Ain Bouziane de Skikda a permis d'obtenir vingt isolats bactériens, ces isolats ont été testés pour leur effet antagoniste, où nous avons constaté que seulement deux isolats bactériens B1 et B15 possèdent un effet antifongique contre les agents phytopathogènes obtenus auparavant, avec des taux d'inhibition qui varient entre 33 et 69%. Cependant, la bactérie B15 a développé le meilleur effet d'inhibition. L'identification morphologique et les tests biochimiques des isolats sélectionnés ont montré que B1 et B15 sont identifiés comme étant *Bacillus sp1.* et *Bacillus sp2.* Les tests *in situ* réalisés en pots sur la tomate ont montré différents effets des agents antagonistes sélectionnés, où *Bacillus sp2* a développé le meilleur effet en considérant les paramètres les plus étudiés (sévérité de la maladie, taille des plantules et nombre de feuilles). Cet impact est dû à la capacité de cette souche à produire des substances antifongiques. Les tests de l'activité enzymatique ont révélé le pouvoir des souches sélectionnées à produire les enzymes, en l'occurrence l'amylase, la lipase, la protéase et la chitinase. Par ailleurs, afin de chercher un nouveau milieu de fermentation à base de produits primaires disponibles et moins cher, pour améliorer la production de la biomasse et des métabolites des souches antagonistes sélectionnées, une étude comparative a été menée entre deux milieux de référence (Landy et optimum) déjà utilisés auparavant et un nouveau milieu alternatif à base de farine de noyaux de dattes, les résultats de cette étude ont montré une bonne production de biomasse et des métabolites dans le nouveau milieu par rapport aux milieux Landy et optimum. Les 2 souches bactériennes sélectionnées *Bacillus sp1.* et *Bacillus sp2.* ont été testées pour leur effet antibactérien à l'encontre de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Enterococcus sp* et *Bacillus subtilis* ATCC 6633. Ces bactéries sont actives contre les trois bactéries à savoir *Pseudomonas*, *Escherichia coli* et *Enterococcus* avec un diamètre d'inhibition qui varie entre 1 et 7mm. Cependant, aucune activité antibactérienne n'est constatée avec la bactérie test ; *Bacillus*. Pour conserver la biomasse des bactéries obtenues après une fermentation de trois jours, ces dernières ont été lyophilisées et transformées en poudre à l'aide d'un lyophilisateur.

**Mots-clefs :** Pomme de terre, *Bacillus sp.*, *Aspergillus sp.*, *Pythium sp.*, *Alternaria sp.*, rhizosphère, bio-contrôle.

### Laboratoires de recherche :

Laboratoire de Biophysique, UMC1

**Encadreur :** Dr. Milet Asma (M.C.B - Université Frères Mentouri, Constantine 1).

**Examineur 1 :** Dr. Cherfia Radia (M.C.B - Université Frères Mentouri, Constantine 1).

**Examineur 2 :** Dr. Benserradj Ouafa (M.C.A – Université Mila).