

Recherche de molécules bioactives d'intérêt à partir d'une collection de souches bactériennes rhizosphériques et étude de leur effet antifongique

H. Oulebsir-Mohandkaci^{1*}, F. Tihar-Benzina, C. Ait Belkacem, A.N. Belgrade

¹Laboratoire de valorisation et conservation des ressources biologiques, Faculté des Sciences, Université M'hamed Bougara, Boumerdes, BP35000, Algérie

*Corresponding author: mohandkacihakimal@gmail.com; Tel.: +213 772 50 19 34

ARTICLE INFO

Article History :

Received : 29/11/2018

Accepted : 24/07/2019

Key Words:

bacteria;
bioactive molecule;
rhizosphere;
antagonism;
phytostimulation.

Mots-clés :

bactérie; molécule
bioactive; rhizosphère;
antagonisme;
phytostimulation.

ABSTRACT/RESUME

Abstract: The aim of the present study is to evaluate the potential of a collection of rhizobacteria strains to produce bioactive compounds of biotechnological interest, as well as the demonstration of its antifungal power.

The isolates studied belong to the *Pseudomonas* spp. fluorescent group and the genus *Bacillus* sp. After determining their physiological and biochemical characteristics, the isolates were tested for their ability to produce hydrolytic enzymes with other molecules.

The study of the antagonistic effect of the isolated bacteria against *Verticillium dahliae* agent of the olive verticillium wilt, was also carried out. The bacterial isolates come from the rhizospheric soil of three crops (loquat, barley and potato) in the Boumerdes region (coastal region in central Algeria).

The study of the production of different enzymes such as lipases and caseinases, as well as indole acetic acid (AIA) and cyanid hydrogenicis (HCN), shows a high production for the majority of the tested strains. In addition, in vitro inhibition of mycelium growth tests using these bacterial strains against *Verticillium dahliae* isolates has given very satisfactory results, with rates of inhibition of mycelial growth reaching 70% in some cases.

Therefore, the isolated bacteria have, for the most part, antagonistic properties against the tested phytopathogenic fungus. They can also be exploited in plant biotechnology in the phytostimulation and improvement of plant growth and nutrition.

Résumé :

Le but de la présente étude est l'évaluation des potentialités d'une collection de souches de rhizobactéries à produire des composés bioactifs d'intérêt biotechnologique ainsi que la mise en évidence de son pouvoir antifongique. Les isolats étudiés appartiennent aux groupes *Pseudomonas* spp. fluorescents et au genre *Bacillus* sp. En effet, après la détermination de leurs caractères physiologiques et biochimiques, les isolats ont été testés pour déterminer leur capacité à produire des enzymes à effet hydrolytique avec d'autres molécules d'intérêt agronomique. L'étude de l'effet antagoniste des bactéries isolées contre *Verticillium dahliae* agent de la verticilliose de l'olivier, a été également réalisée. Les isolats bactériens proviennent du sol rhizosphérique de trois plantes cultivées (Nèfle, Orge et

pomme de terre) dans la région de Boumerdes (région côtière située au centre de l'Algérie).

L'étude de la production des différentes enzymes telles que les lipases et les caseinases, ainsi que l'acide indole acétique (AIA) et l'acide cyanhydrique (l'HCN) montrent une bonne de production pour la majorité des souches testées.

*Par ailleurs, l'étude de l'effet inhibiteur des souches bactériennes effectuées in vitro contre le *Verticillium dahliae* à donnée des résultats très satisfaisant avec des taux d'inhibition de la croissance mycélienne qui peuvent atteindre 70% dans certain cas.*

I. Introduction

Le sol est le siège de compétition microbienne due à la richesse biologique très variée, la flore microbienne y est très diversifiée [1, 2]. La rhizosphère est la zone du sol où la plupart des réactions sont affectées par les racines des plantes. La communauté microbienne dans cette partie du sol possède le plus grand réservoir de diversité biologique au monde [3]. Les bactéries sont les représentants les plus importants quantitativement par rapport aux autres microorganismes du sol. Parmi les bactéries qui colonisent la rhizosphère, les rhizobactéries promotrices de la croissance végétale (PGPR) possèdent plusieurs facteurs caractéristiques intrinsèques qui les rendent particulièrement intéressantes en vue de leur utilisation comme agents de lutte biologique (BCAs) [4, 5].

Les fonctions les plus connues des PGPR sont la biofertilisation, la phytostimulation, et le biocontrôle. Le mode d'action de ces bactéries implique un mécanisme complexe qui favorise la croissance de la plante, son développement et sa protection [6]. Des effets bénéfiques sur le plan écologique ont été également signalés, avec ces rhizobactéries, par leur rôle dans la dégradation de certaines substances xénobiotiques dans le sol [7]. Par ailleurs, les souches bactériennes de la rhizosphère présentent pour la plupart, des propriétés antagonistes vis-à-vis des champignons phytopathogènes, leur stratégie est basée soit sur un potentiel inhibiteur de l'agent causal, soit l'habilité d'accroître le mécanisme de défense de la plante [8]. Parmi les antagonistes qui règnent dans les sols saturés en microflore équilibrée pour le milieu et le biotope, on rencontre presque toujours des espèces du genre *Pseudomonas* et *Bacillus*, ces microorganismes ont une grande capacité à produire des substances antimicrobiennes et à entrer en compétition spatiale et nutritionnelle avec les agents phytopathogènes. Le contrôle des phytopathogènes de manière biologique est plus avantageux pour l'environnement en comparaison avec le contrôle chimique [9].

Notre travail a pour objectif, l'identification des métabolites secondaires et d'enzymes tels que les lipases et les caseinases, la mise en évidence du

pouvoir de production des phytohormones (AIA), l'acide cyanhydrique ainsi que l'étude de l'effet antagoniste des isolats bactériens étudiés contre le *V. dahliae* agent de la verticilliose vasculaire sur olivier.

II. Materials and methods

II.1. Matériel biologique

Les bactéries utilisées dans notre étude, appartiennent aux genres *Pseudomonas*, et *Bacillus*, elles ont été isolées de la rhizosphère de trois plantes cultivées (nèfle, orge et pomme de terre), dans la région de Boumerdes situé à 50 Km de la capitale d'Alger au bord de la méditerranée (Latitude: 36.7667, Longitude: 3.46667, 36° 46' 0" N, 3° 28' 0" E).

Deux souches fongiques ont été utilisées, ces souches appartiennent à l'espèce *Verticillium dahliae* à savoir le V1 et le V2 appartenant au pathotype défoliant et non défoliant isolés et caractérisés par Benzina et al. [8].

II.2. Caractérisation phénotypique

La caractérisation des *Pseudomonas* spp. et *Bacillus* sp. est effectuée par différentes méthodes basées sur des critères morphologiques, biochimiques et physiologiques.

En effet, après purification, les colonies obtenues sur milieu solide (gélose nutritive pour les *Bacillus* et King B pour les *Pseudomonas* spp. fluorescents) sont observées à l'œil nu. Leur étude macroscopique est basée sur les éléments d'identification donnés par Joffin et Leyral [10].

L'étude microscopique s'est basée sur la coloration de Gram et la coloration de la spore [11, 12]. Enfin 20 tests biochimiques, ont été réalisés par l'utilisation des galeries API 20NE avec d'autres tests classiques tel que catalase et oxydase [12, 13].

II.3. Mise en évidence de la production des molécules bioactives

La production d'enzymes

Production de la caséinase (hydrolyse de la caséine de lait) : la présence de cette activité est détectée par la formation après ensemencement de la bactérie sur gélose au lait, d'un halo clair autour de la strie d'ensemencement [14].

Production de lipases : Le milieu décrit par Sierra [15] a été utilisé pour détecter la production des

enzymes lipolytiques dans lequel le Tween est utilisé comme substrat lipidique. Si la souche possède une activité lipolytique, la précipitation des cristaux sera visible sous forme d'un halo opaque autour des colonies.

Synthèse de l'acide indole acétique (AIA)

La production d'AIA est déterminée en étalant une colonie isolée sur gélose Luria Bertani additionnée de L-tryptophane, SDS, et de glycérol. La gélose est ensemencée par la bactérie à tester et le couvercle de la boîte de Pétri est recouvert de papier Whatman, puis incubés à 30°C. Le papier est récupéré, puis traité avec le réactif de Salkowski [16,17].

Production de substances volatiles (HCN)

La cyanogénèse a été évaluée sur milieu liquide à base de glycine [18], après incubation, des bandelettes de papier Whatman saturées avec une solution de picrate alcaline, sont suspendues verticalement dans la culture liquide. Le picrate de sodium présent dans le papier change de couleur en fonction de la production d'HCN [19].

II.4. Test de sélection des bactéries antagonistes

En vue de localiser d'éventuelles activités antagonistes in vitro, les isolats bactériens issus des opérations de purification et d'identification ont été testés pour évaluer leurs activités antifongiques vis-à-vis des isolats cryptogamiques de *Verticillium dahliae* [20].

La méthode utilisée consiste à déposer un disque mycélien de 5mm de diamètre de l'isolat cryptogamique à étudier au centre d'une boîte de Pétri contenant le milieu PDA, après 24h d'incubation à 25°C, une suspension bactérienne a été étalée à la périphérie de la boîte d'une façon opposée, ensuite les cultures sont incubées à 25°C pendant 5 à 7 jours. Le témoin est préparé de la même sorte à l'exception que la boîte contient le mycélium fongique seulement sans la suspension bactérienne. La lecture des résultats se fait en comparaison avec la croissance du témoin.

La lecture selon le diamètre des zones d'inhibition.

- Non antagonistes

-/+ Présence d'une moyenne activité antagoniste

+ Action antagoniste importante

II.5. Effets des bactéries antagonistes sur la croissance mycélienne des isolats fongiques

Seules les bactéries ayant montré une activité antagoniste dans la sélection précédente, sont retenues pour une deuxième confrontation avec les isolats fongiques sur le milieu de culture cité

précédemment, afin de confirmer leurs activités antagonistes et estimer les pourcentages d'inhibition.

Le pourcentage d'inhibition a été calculé comme suit :

$$I (\%) = (1 - D_n / D_0) \times 100$$

D_n : diamètre en présence de l'isolat bactérien.

D₀ : diamètre en absence de l'isolat bactérien (témoin).

II.6. Analyse statistique

La signification des principaux effets a été déterminée par l'analyse de la variance (ANOVA). Les valeurs ($p \leq 0,05$) sont considérées comme statistiquement significatives. Nous avons également appliqué le test de Tuckey entre les combinaisons. Le logiciel utilisé est le Statistica 6.

III. Results and discussion

III.1. Caractérisation phénotypique des isolats

Etude des caractères macroscopiques et physiologiques : Après incubation des bactéries isolées sur milieu GN à 30°C pendant 24h, nous avons constaté l'apparition de colonies distinctes visibles à l'œil nu présentant les critères morphologiques spécifiques du genre *Pseudomonas* et du genre *Bacillus* (figure 1).

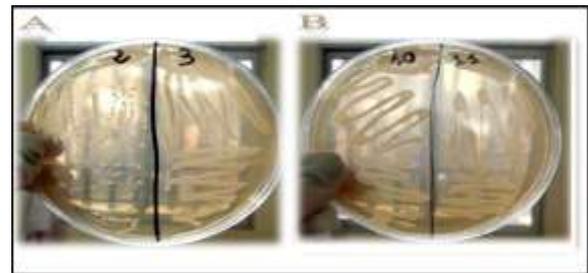


Figure 1. Aspect morphologique des isolats de *Bacillus* sp. et de *Pseudomonas* sp.

A : isolats 2 et 3 du genre *Bacillus* sp. ; B : isolat 10 du genre *Pseudomonas* sp.

L'unique isolat de *Pseudomonas* spp. fluorescents est caractérisée par une croissance rapide sur milieu GN, donnant des colonies crème à beige, de forme circulaire, lisse, d'aspect régulier. L'observation microscopique révèle des bacilles droits ou légèrement incurvés à bouts arrondis. Les cellules se présentent isolées ou groupées par deux. Elles sont asporulées. Après réalisation de la coloration de Gram, la souche bactérienne apparaît avec une couleur rose, donc ce sont des bacilles à Gram négatifs. En effet, les bactéries appartenant au genre

Pseudomonas sont de petits bâtonnets avec une ciliature polaire, présentant un Gram négatif [11]. Les isolats de *Bacillus* sp. isolées sont caractérisées par une croissance rapide sur milieu GN, donnant des colonies de couleur crème à blanchâtres. L'observation microscopique révèle des bacilles strictement droits, dont les cellules se présentent isolées ou groupées, et sont dans la plupart des cas sporulantes. En effet, la coloration de la spore bactérienne au vert de Malachite a révélé la présence de spores chez les isolats de *Bacillus* sp.

Après réalisation de la coloration de Gram, la paroi bactérienne des isolats testés apparait de couleur bleue violacée. Il s'agit donc de bacilles à Gram positif. [14]. (Figure 2).

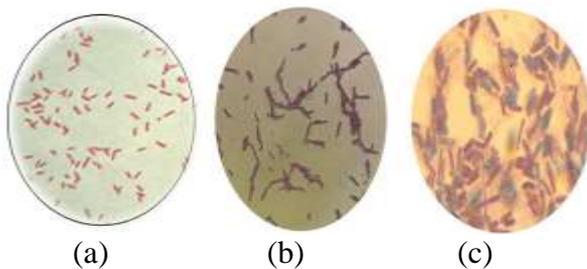


Figure 2. Aspect microscopique de *Pseudomonas* spp. fluorescents (a) et *Bacillus* sp. (b) après coloration de Gram et coloration de la spore (c) (Gx100).

Pour l'étude physiologique des *Pseudomonas fluorescens* spp., la mise en évidence de l'oxydase a permis l'apparition de la couleur violette foncé sur le disque d'oxydase chez la souche 11 entraînant une réponse positive. Le test de catalase a indiqué l'absence de bulles gazeuses sur la lame chez la même souche, montrant une réponse négative, ce qui indique qu'il n'y a pas eu décomposition du peroxyde d'hydrogène. La culture de cette souche sur milieu King B a montré une production d'un pigment vert fluorescent [8].

Pour les *Bacillus*, l'apparition de la couleur violette foncée sur le disque d'oxydase chez les souches 1, 13 et 14, montre une réponse positive, indiquant qu'il y a eu oxydation du réactif phénylène diamine pour former un composé coloré en violet. Par contre, l'absence de la coloration en violet chez les souches 2 et 15, indique qu'il n'y a pas eu oxydation du réactif. Le test de l'oxydase considéré comme caractère taxinomique permettant de discriminer aisément les *Pseudomonas* fluorescents [21, 22, 23]; ainsi que le test de l'arginine dihydrolase qui est considéré comme déterminatif a été pratiqué sur toutes les souches de la collection [22]. Par contre, l'apparition de bulles gazeuses (effervescence) sur la lame chez les souches 1, 13, 15, 16, 17 et 24 montrent une réponse positive, indique qu'il y a eu décomposition du peroxyde d'hydrogène, l'absence de

l'effervescence chez la souche 25, indique qu'il n'y a pas eu décomposition [12].

Etude des caractères biochimiques des isolats: Cette étude est réalisée en utilisant des galeries API 20 NE. Les souches ont montré des réponses variables aux 20 tests réalisés. Les résultats sont résumés dans le tableau ci-dessous :

Tableau 1. Résultats des tests biochimiques réalisés sur les bactéries isolées

T	S	1 OD .ER	2 OD .E R.	3 O D .R	4 PD .ER	5 OD.E R.	6 OD.E R.	7 O D .R	8 ND.E R.	9 ND .R	10 ND .R	11 OD.R	12
1	NO.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2	TRP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	GLU	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	ADH	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5	URE	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6	ESC	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
7	GEL	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8	ONP G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	GLU	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10	ARA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11	MNE	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
12	MAN	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
13	NAG	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
14	MAL	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
15	GNI	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
16	CAP	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
17	ADI	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
18	MLI	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
19	CIT	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
20	PAC	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Les isolements effectués ont permis de sélectionner 6 isolats de l'endorhizosphère (ER), 5 isolats du sol rhizosphérique (R) et un isolat du rhizoplan (RH).

Bien que les sites étudiés présentent des différences importantes du point de vue climat et sol, nous notons la présence de populations appréciables de bactéries. Le caractère ubiquiste et le pouvoir d'adaptation à des conditions écologiques variées a été mentionnée dans de nombreux travaux [23, 24, 25, 26, 27].

Cette distribution peut être due à une capacité adaptative, génétique et physiologique élevée [28]. La présence de nombreux îlots génomiques dans le patrimoine de ces bactéries, est la clé de cette adaptabilité aux environnements ubiquistes [29].

Sur une collection de 22 souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents isolées à partir du sol rhizosphérique de l'olivier au nord de l'Algérie, une similitude de 80% a été constaté entre les isolats selon les résultats des tests physiologiques, biochimiques et génétiques par la multiplication des séquences palindromiques répétées (ERIC et REP) [30]. Un total de 17 souches bactériennes a été isolé de la rhizosphère du blé au niveau de la région d'Adrar située au désert Algérien. Le séquençage de l'ARN16 a permis d'affilier ces isolats aux genres *Bacillus*, *Pseudomonas* et *Enterobacter* [31].

III.2. Production de molécules bioactives

Il s'avère à la lumière des résultats obtenus que toutes les bactéries testées soient productrices de lipases (100%) et 70 % produisent la caseinase.

L'étude de l'activité lypolytique ainsi que les autres activités hydrolytiques sont des tests très indispensables dans la classification des *Pseudomonas* spp. Fluorescents et des *Bacillus*. Les lipases permis surtout la différenciation entre l'espèces *P. fluorescens* et *P. chlororaphis* [22]. Alors que la gélatinolyse permis la séparation entre les biovars de l'espèce *fluorescens* et les biovars de l'espèce *putida* [23].

L'ensemble des activités enzymatiques étudiées peuvent nous renseigner sur l'aptitude de ces souches à coloniser les différentes rhizosphères. Les souches qui ont les capacités de produire une gamme diversifiée d'enzymes, peuvent coloniser rapidement et efficacement les rhizosphères [24].

La production de l'acide indole acétique AIA et/ou de ses composés apparentés a été observée uniquement chez l'isolat de *Pseudomonas* sp. (S11). Cet isolat producteur de ce métabolite a développé une coloration rose à la suite de l'addition du réactif révélateur (de Salkowski) après 20mn d'incubation. Tandis que pour isolats de *Bacillus* sp., nous n'avons remarqué aucun changement de couleur sur ce dernier. Le résultat est donc négatif pour les isolats de ce genre.

Ayant saturé les bandelettes de papiers Whatman avec la solution de Picrate alcaline et les avoir suspendus au-dessus des Erlens Meyer contenant les suspensions bactériennes, aucun changement de couleur ne nous est apparu pour la majorité des isolats. Il n'y a donc pas de production d'HCN et le résultat est négatif pour l'ensemble des isolats de *Bacillus*

Les rhizobactéries ou PGPR favorisant la croissance des plantes sont un groupe de microorganismes diversifié présentant deux caractéristiques principales, la capacité de coloniser la rhizosphère d'une part et d'autre part une influence positive sur la croissance de la plante à laquelle elles sont associées [32].

A partir des résultats obtenus, nous avons constaté que les isolats bactériens appartenant aux groupes *Pseudomonas* spp. fluorescent et *Bacillus* sp., ont montré une dégradation de plusieurs substrats tels que les lipides et les protéines, avec production d'AIA et d'HCN pour l'isolat de *Pseudomonas*.

La production d'enzymes hydrolytiques a été décrite chez de nombreuses bactéries impliquées dans le biocontrôle [33]. La synthèse d'AIA et HCN est largement répandue chez les *Pseudomonas* sp. fluorescents [34].

La production de l'HCN qui semble confinée aux protéobactéries a été mise en évidence chez plusieurs

souches de *Pseudomonas fluorescens* [35]. Certains travaux suggèrent que la production de cyanure d'hydrogène par *P. fluorescens* C7R12 liée avec la disponibilité de fer dans le milieu, pourrait être impliquée dans un effet antagoniste.

En effet, il a été démontré que la stimulation de la croissance des plantes bactérisées peut être due à la synthèse microbienne de substances de croissance analogues aux phytohormones telles que l'AIA, qui a été identifiés chez ces rhizobactéries. Cette phytohormone est impliquée dans tous les aspects de leur croissance et de leur développement [36].

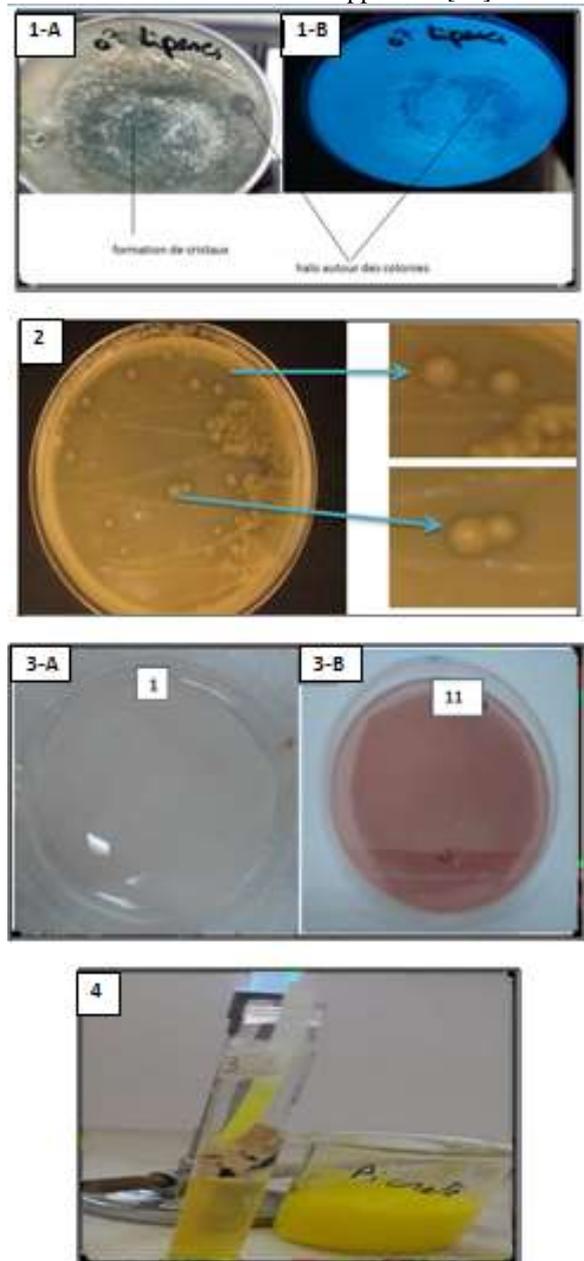


Figure 3. Résultats de la recherche de molécules bioactives chez les bactéries isolées

- 1) activité lipolytique observée chez certaines souches de *Bacillus* sp. (A : observée à l'œil nu; B : observée sous lumière UV à 350 nm);
- 2) Résultats positifs de l'activité caséinase de certains isolats de *Bacillus* sp. ;
- 3) Résultats du test de production de l'AIA. A : négatif pour tous les isolats de *Bacillus* sp. (Exemple souche 1) ; B : positif pour la souche 11 de *Pseudomonas* sp.
- 4) Absence de changement de couleur dans les bandelettes de papier Whatman ceci indique un résultat négatif pour la production d'HCN chez les souches de *Bacillus*.

III.3. Résultats de l'activité antagoniste des souches bactériennes *in vitro*

Le pouvoir antagoniste des isolats a été testé par l'inhibition de la croissance mycélienne des deux isolats cryptogamiques de *V. dahliae* à savoir la souche V1 et la souche V2.

Les résultats montrent que 91,67% des isolats bactériens ont inhibé la croissance mycélienne des deux isolats de *V. dahliae* ; V1 et le V2 (Figure 4 et 5).

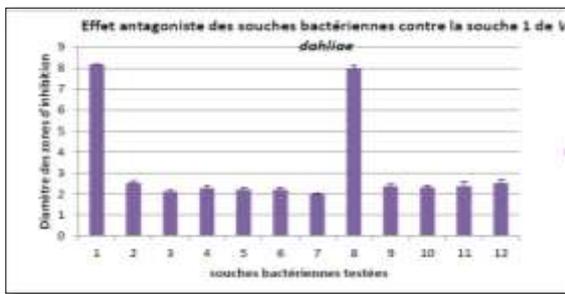


Figure 4. Effet antagoniste des isolats bactériens sur la souche 1 de *V.dahliae*.

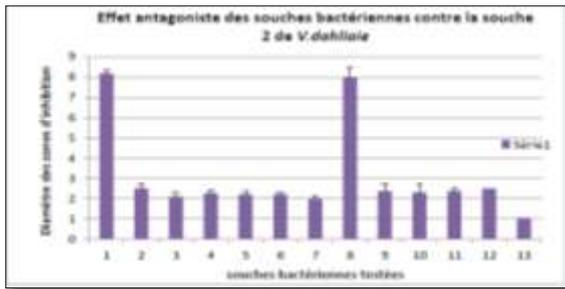


Figure 5. Effet antagoniste des isolats bactériens sur la souche 2 de *V. dahliae*

L'intensité d'inhibition varie selon la souche fongique testée et la souche bactérienne utilisée. Les souches bactériennes S06, S01, S07, S12 ont donné les meilleurs résultats, avec des Pourcentages d'inhibition respectifs de 64%, 47%, et 40%. L'activité antagoniste la plus importante a été observée avec la souche bactérienne S06 sur la souche fongique V1 de *V. dahliae* appartenant au pathotype non défoliant (tableau 2).

L'inhibition de la croissance mycélienne par les isolats de *Pseudomonas* observée sur milieu PD suggère qu'elle n'est pas due à l'action des sidérophores mais à d'autres mécanismes développés par la bactérie, contrairement à l'inhibition sur le milieu B de King qui est liée probablement à la synthèse de sidérophores. Ceci suggère que nos souches possèdent plusieurs autres mécanismes d'action tels que la synthèse d'antibiotiques et d'HCN.

En culture *in vitro*, la production d'HCN peut même inhiber la croissance de plusieurs champignons phytopathogènes via la phase gazeuse [37], par une action directe sur les cellules en bloquant la cytochrome oxydase dans la chaîne respiratoire.

Tableau 2. Inhibition de la croissance mycélienne de *Verticillium dahliae* par les isolats de *Pseudomonas* spp. fluorescents et *Bacillus* sp. testées sur milieu PDA.

isolats bactériens	Pourcentage d'inhibition		P
	V1	V2	
1	47 ± 0 a	34 ± 0.2 b	< 0.001
2	30 ± 0.1 b	46 ± 0.25 a	< 0.001
3	34 ± 0.05 b	40 ± 0.2 a	< 0.001
4	30 ± 0.1 b	43 ± 0.15 a	< 0.001
5	36 ± 0.1 b	43 ± 0.15 a	< 0.01
6	64 ± 0.1 a	47 ± 0.1 b	< 0.001
7	40 ± 0.06 a	42 ± 0.1 a	NS
8	0 b	39 ± 0.47 a	< 0.001
9	30 ± 0.1 b	40 ± 0.3 a	< 0.01
10	32 ± 0.11 b	39 ± 0.44 a	< 0.01
11	34.7 ± 0.2 a	36 ± 0.1 a	NS
12	40 ± 0.15 b	72 ± 0.1 a	< 0.001

a-b: des lettres indiquant des différences significatives entre les moyennes d'une même souches bactérienne selon le test de Tukey à p < 0,05; NS: différence non significatif

L'utilisation de microorganismes bénéfiques pour la gestion de maladies liées au sol a attiré l'attention d'une pléiade de scientifiques à travers le monde depuis de nombreuses années.

Les bactéries bénéfiques emploient différents mécanismes pour exercer leur action d'antagoniste à savoir la synthèse d'antibiotiques, la production de sidérophores, la sécrétion de divers enzymes, la synthèse d'hormones et l'induction d'une résistance chez les plantes [38, 39, 40, 41, 42].

Les bactéries antagonistes contrôlent et réduisent efficacement le pouvoir pathogène de plusieurs champignons phytopathogènes tel que le *V.dahliae*. Ceci a été démontré dans diverses études menées précédemment [8, 43, 44, 45].

Pseudomonas fluorescens s'est avérée être plus efficace que *Bacillus*. Toutefois, ce dernier a présenté également des activités intéressantes due à la synthèse de certaines biomolécules de nature protéique dotée de propriétés catalytiques comme les enzymes [46].

Une collection d'isolats bactériens provenant de plants d'oliviers sains produits en pépinière, a été testée contre *V. dahliae*. Cette étude a montré que parmi ces isolats, 3 souches de *Pseudomonas* spp. sont efficaces contre le pathotype D de *V. dahliae* dans des conditions non gnotobiotiques, parmi lesquelles, la souche PICF141 attribuée au sous-groupe *P. mandelii* du groupe *P. fluorescens* était l'ABC la plus prometteuse [47].

Benzina et al., [8] à démontré que sur un total de 60 souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents isolées à partir de la rhizosphère de l'olivier non atteint par la Verticilliose, six souches ont engendré une inhibition totale de la croissance mycélienne sur le milieu King B. Alors que sur le milieu PDA, les taux d'inhibition calculés vont de 36.9% à 50%. L'activité antagoniste la plus importante a été observée avec la souche bactérienne T34 contre la souche fongique V1 (pathotype défoliant). Cette dernière identifiée par le séquençage de l'ARN 16S comme étant *Pseudomonas putida* a montré un pouvoir antagoniste dépassant celui de la souche de référence *Pseudomonas fluorescens* CHAO connue pour ses potentialités inhibitrices et la diversité de ses métabolites à effet antagonique, notamment vis-à-vis de *Thielaviopsis basicola*, agent de la pourriture noire sur tabac [48]. Donc le degré d'antagonisme varie selon les interactions mises en jeu entre les souches bactériennes et le pathotype de *V. dahliae*.

Par ailleurs, deux nouvelles bactéries du genre *Bacillus*; *Paenibacillus polymyxa* et *Paenibacillus terrae* (souches PIC73 et PIC167) provenant d'oliviers produits en pépinière ont entraîné une inhibition de la croissance *in vitro* de différents agents pathogènes de l'olivier et une bonne efficacité contre *Verticillium dahliae*. L'isolat PIC73 étant l'ACB la plus efficace [49].

IV. Conclusion

La caractérisation d'une collection de rhizobactéries, la mise en évidence de leur pouvoir de synthèse de molécules bioactives et l'étude de leur activité à l'égard d'un champignon phytopathogène *Verticillium dahliae* constituent l'essentiel de notre étude.

L'isolement bactérien a permis de dénombrer une microflore bactérienne abondante appartenant surtout au genre *Bacillus*. La quasi-totalité des souches testées sur la production d'enzymes a donné des

résultats encourageants; 100% des bactéries testées sont productrices de lipases et 70 % produisent la caseinase. Par contre les deux phytostimulants (AIA et HCN,) sont absents chez la majorité des souches testées.

Les essais effectués *in vitro*, nous ont permis de mettre en évidence des effets antagonistes de la majorité des souches bactériennes testées. *Pseudomonas fluorescens* a montré une efficacité meilleure contre les deux isolats cryptogamiques de *Verticillium dahliae* par rapport au genre *Bacillus*.

Il apparaît donc clairement que plusieurs mécanismes peuvent être impliqués. Ces mécanismes reposent essentiellement sur la production de différents métabolites bactériens et d'enzymes. Ainsi, compte tenu de la diversité et de la complexité des interactions entre la microflore, le sol et la plante, plus les mécanismes mis en oeuvre seront variés, plus l'efficacité des agents antagonistes microbiens sera assurée.

Par ailleurs, la mise au point d'autres tests permettra de révéler d'autres aspects de l'activité antagoniste des souches bactériennes testées et de rechercher des espèces plus efficaces afin de les utiliser dans la lutte contre les maladies d'origine tellurique. Les techniques de génie génétique peuvent aussi permettre d'amplifier la synthèse de métabolites intéressants.

Enfin, ces effets antagonistes non négligeables pourraient s'ajouter aux autres méthodes de lutte biologiques appliquées contre les organismes phytopathogènes. En outre, ces isolats pourraient être exploités en biotechnologie végétale dans la phytostimulation et l'amélioration de la nutrition des plantes. Ils pourraient aussi trouver leur place dans d'autres applications biotechnologiques visant notamment une amélioration des rendements et la préservation de l'environnement pour un développement durable.

V. References

1. Faugier, A. Diversité bactérienne des sols : accès aux populations à effectifs monitrinaires " the rare biosphere ". Sciences du Vivant [q-bio]. Thèse de doctorat. Ecole Centrale de Lyon, (2010).
2. Tarlera, S.; Jangid, K.; Ivester, AH.; Whitman, WB.; Williams, MA. Microbial community succession and bacterial diversity in soils during 77,000 years of ecosystem development. FEMS Microbiology Ecology 64 (2008.) 129-140.
3. Bashir, O.; Khan, K.; Hakeem, K.R.; Mir, N.A.; Rather, G.H.; Mohiuddin, R. Soil Microbe Diversity and Root Exudates as Important Aspects of Rhizosphere Ecosystem. Chapter From book Interaction Among Rhizospheric Microbes, Soil, and Plant Roots: Influence on Micronutrient Uptake and Bioavailability. January 2016, DOI: 10.1007/978-3-319-29573-2_15
4. Van Loon, L.C.; Bakker, P.A.H.M.; Pieterse, C.M.J. Prospects and challenges for practical application of rhizobacteriamediated induced systemic resistance ».

- In: Induced Resistance in Plants Against Insects and Diseases (A. Schmitt and B. Mauch-Mani, eds), IOBC/WPRS Bulletin 25(6)(2002) 75-82.
5. Weller, D.M. Pseudomonas biocontrol agents of soilborne pathogens: looking back over 30 years. *Phytopathology*; 97 (2007) 250-6.
 6. Morgan, J.A.; Bending, G.D.; White, P.J. Biological costs and benefits to plant-microbe interactions in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany* 56(2005)1729–1739.
 7. Benchabane, M.; Toua, D.; Ameer, D. Exploitation et valorisation des rhizobactéries En biotechnologie végétale : Phytostimulation et amélioration de la nutrition des plantes. *Revue Agrobiologia* 2(2012)17-20.
 8. Benzina, F.; Sahir-Halouane, F.; Hamed, K. Algerian isolates of fluorescent Pseudomonas spp. as potential biological control against wilt pathogen (*Verticillium dahliae*). *Plant Omics journal* 9(1) (2016) 48 -60.
 9. Nautiyal, C.S. Biocontrol of plant diseases for agricultural sustainability. In: Upadhyay, R.K.; Mukerji, K.G.; Chamola, B.P.; Biocontrol Potential and its Exploitation in Sustainable Agriculture, Vol.I: Crop Diseases, Weeds, and Nematodes. Ed. Kluwer Academic, New York, (2001)9-23.
 10. Joffin, J.N.; Leyral, G. Microbiologie technique, TI-Dictionnaire des techniques. Ed. Bordeaux:CRDP d'aquitaine. (2006) 368 p.
 11. Pervot, A.R. Traité de systématique bactérienne. Ed. Dunod. TI, (1961) 471p.
 12. Singleton, P. Bactériologie pour la médecine. La biologie et la Biotechnologie. Ed. Dunod. Paris. (2005)541 p.
 13. Perry, J.J.; Staley, J.T.; S. Lorey S. Microbiologie, Cours et questions de révision. Ed. Dunod. Paris. (2004) 890 p.
 14. Guiraud, J.P., Microbiologie alimentaire. Ed. Dunod. Paris, 2003.
 15. Sierra, G. A simple method for the detection of lipolytic activity of microorganisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates. *Chemistry, Medicine. Antonie van Leeuwenhoek*. 23(1957)15-22.
 16. Kaldewey, H. Transport and other modes of movements of hormones (mainly auxins). In *Encyclopedia of plant physiology. Hormonal Regulation of Development II* (T.K.Scott, ed.), 10(1984) 80-148. Springer-Verlag, Berlin.
 17. Naik, P.R.; Sakthivel, N. Functional characterization of a novel hydrocarbonoclastic Pseudomonas sp. Strain PUP6 with plant-growth-promoting traits and antifungal potential. *Research in Microbiology* 157(2006) 538-546.
 18. Meena, B.; Marimuthu, T.; Vidhyasekaran, P.; Velazhahan, R. Biological control of root rot of groundnut with antagonistic Pseudomonas fluorescens. *Journal of Plant Diseases and Protection* 108(2001) 369 – 381.
 19. Verma, M.; Satinder, K.; Brar, R.D.; Tyagi, R.Y.; Surampalli, J.; Valero, R. Antagonistic fungi *Trichoderma* spp: *Panoply of Biological control. Biochemical Engineering Journal* 37 (2007)1-20.
 20. Chandrashekhara, K.N.; Manivannan, S.; Chandrashekhara, C.; Chakravarthi, M. Biological Control of Plant Diseases. Chapter · January 2012 In book: Ecofriendly Innovative Approaches in Plant Disease Management, Chapter: 10, Publisher: International Book Distributors, Editors: Vaibhav K. Singh Yogendra Singh Akhilesh Singh.
 21. Palleroni, N. Gram negative aerobic rods and cocci : Family I Pseudomonadaceae. In: *Bergey's manual of bacteriology* 1. Ed. Kerg and Holt, William and Wilkins. Baltimore. (1984)141-168.
 22. Jacques, M.A. Ecologie quantitative et physiologie de la communauté bactérienne épiphyllle de Cichorium endiva var .Latifolia. Thèse doctorat, université de Parissud- Orsay, France, (1994)111p.
 23. Bossis, E.; Lemanceau, P.; Latour, X.; Gardan L. The taxonomy of Pseudomonas fluorescens and Pseudomonas putida: current status and need for revision. *Agronomie*. 20(2000) 51-63.
 24. Lemanceau, P.; Barretx, M.; Mazurier, S.; Mondy, S.; Pivato, B.; Fort, T.; Vacher, C. Plant communication with associated microbiota in the spermosphere, Rhizosphere and Phyllosphere : 101-133 Chapter in *Advances in Botanical Research*. 2016 , V .82. ISSN 0065-2296. Elsevier Ltd.
 25. Csotonyi, J.T.; Swiderski, J.; Stackebrandt, E.; Yurkov, V. A new environment for aerobic anoxygenic phototrophic bacteria: biological soil crusts. *Environmental Microbiology Reports* 2(2010) 651-656.
 26. Galand, P.E.; Lovejoy, C.; Pouliot, J.; Garneau, M.E.; Vincent, W.F. Microbial community diversity and heterotrophic production in a coastal Arctic ecosystem: A stamukhi lake and its source waters. *Limnology and Oceanography* 53(2008) 813-823.
 27. Khemili-Talbi, S.; Kebbouche-Gana, S.; Akmoussi-Toumi, S.; Gana, M.L.; Lahiani, S.; Angar, Y.; Ferrioune, I. Biodegradation of Petroleum hydrocarbons and Biosurfactant production by an extremely halophilic Archaea Halovivax sp. A21, Algerian *Journal of Environmental Science and Technology* 3:3-B (2017) 56-64.
 28. Spiers, A.J.; Buckling, A.; Rainey, P.B. The causes of Pseudomonas diversity. *Journal of Microbiologie* 146 (2000) 2345–2350.
 29. Battle, A.R.; Petrov, E.; Pal, P.; Martinac B. Rapid and improved reconstitution of bacterial mechanosensitive ion channel proteins MscS and MscL into liposomes using a modified sucrose method. *FEBS Letters* 583(2009) 407–412.
 30. Tihar-Benzina, F.; Hameed, K. M.; Sahir-halouane, F. Biotechnological studies of several isolates of fluorescent pseudomonads from algerian soil as potential biological control agents against olive wilt pathogen *Verticillium dahliae*. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*. 25(3) (2015) 721-728.
 31. Oulebsir-Mohandkaci, H.; Khemili-Talbi, S.; Benzina, F.; Halouane, F. Isolation and identification of entomopathogenic bacteria from algerian desert soil. study of their effects against migratory locust *Locusta migratoria*. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*. 25(3) (2015) 739-746.
 32. Loper, J. E.; Gross, A. H. Genomic analysis of antifungal metabolite production by Pseudomonas fluorescens Pf-5. *European Journal of Plant Pathology* 119(2007)265–278.
 33. Viswanathan, R.; Samiyappan, R. Antifungal activity of chitinases produced by some fluorescent Pseudomonads against *Colletotrichum falcatum* Went. Causing red rot disease in sugarcane. *Microbiological Research* 155(2001) 309– 314.
 34. Persello-Cartieaux, F.; Nussaume, L.; Robaglia, C. Tales from the underground: molecular plant-rhizobacteria interactions. *Plant, Cell and Environment* 26(2003)189–99. doi: 10.1046/j.1365-3040.2003.00956.x.
 35. Laville, J.; Blumer, C.; Von Schroetter, C.; Gaia, V.; Défago, G.; Keel, C.; Haas, D. Characterization of the hcnABC gene cluster encoding hydrogen cyanide synthase and anaerobic regulation by ANR in the strictly aerobic biocontrol agent Pseudomonas fluorescens CHA0. *Journal of Bacteriology* 180(12) (1998)3187-96.
 36. Remans, R.; Croonenborghs, A.; Torres Gutierrez, R.; Michiels, J.; Vanderleyden, J. Effects of plant growth promoting rhizobacteria on nodulation of *Polus vulgaris* L. are dependent on plant P nutrition. *European Journal of Plant Pathology* 119(2007)341–351 DOI 10.1007/s10658-007-9154-4.

37. Blumer, C.; Haas, D. Mechanism, regulation, and ecological role of bacterial cyanide biosynthesis. *Archives of Microbiology* 173(2000)170-177.
38. Thomashow, L.S.; Weller, D.M. Role of antibiotics and siderophores in biocontrol of take-all disease of Nader Hassan-zadeh, wheat. *Plant Soil* 129 (1990) 93–99.
39. Pierson, E.A.; Weller, D.M. Use of mixture of fluorescent pseudomonads to suppress take-all and improve the growth of wheat. *Ecology and epidemiology-Phytopathology*, 84(9)(1994) 940-947.
40. Amer, G.A.; Utkhede, R.S. Development of formulation of biological agents for the management of root rot lettuce and cucumber. *Canadian Journal of Microbiology* 46 (9) (2000) 809–816.
41. Manjula, K.; Krishna, G.K.; Podile, A.R. Whole cell of *Bacillus subtilis* AFI proved more effective than cell-free and chitin-ase-based formulations in biological control of citrus fruit rot and groundnut rust. *Canadian Journal of Microbiology* 50 (9) (2004) 737–744.
42. Collins, D.P.; Jacobsen, B. Optimizing a *Bacillus subtilis* isolate for biological control of sugar beet *Cercospora* leaf spot. *Journal of Biological Control* 26 (2) (2003)153–161.
43. Jataraf, J.; Radhakrishnan, N.V.; Hannk, P.; Sakoof, R. Biocontrol of tomato damping-off caused by *Pythium aphanidermatum*. *Biocontrol* 15(2005) 55–65.
44. Mercado-Blanco, J.; Iiguez-Jurado, D.R.; Hervas, A.; Jimenez-Diaza, R.M. Suppression of *Verticillium* wilt in olive planting stocks by root-associated fluorescent *Pseudomonas* spp. *Journal of Biological Control*. 30 (2004) 474–486
45. Jorjani, M.; Heydari, A.; Zamanizadeh, H.R.; Rezaee, S.; Naraghi, L. Controlling sugar beet mortality disease by application of new bioformulations. *Journal of Plant Protection Research* 52 (3) (2011) 303–307.
46. Chen, C.; Belanger, R.R.; Benhamou, N.; Paullitz, T.C. Defense enzymes induced in cucumber roots by treatment with plant-growth promoting rhizobacteria (PGPR). *Physiology and molecular plant pathology* 56 (1) (2000) 13–23.
47. Gómez-Lama Cabanás, C.; Legarda, G.; Ruano-Rosa, D.; Pizarro-Tobías, P.; Valverde-Corredor, A.; Niqui, J. L.; Triviño, J. C.; Roca, A.; Mercado-Blanco, J. Indigenous *Pseudomonas* spp. strains from the olive (*Olea europaea* L.) rhizosphere as effective biocontrol agents against *Verticillium dahliae*: from the host roots to the bacterial genomes. *Frontiers in Microbiology*, 9 (277) (2018) 1-9.
48. Kyselkova, M.; Kopecky, J.; Frapoli, M.; Defago, G.; Sagova-Mareckova, M.; Grundmann, G.; Moenne-Loccoz, Y. Comparison of rhizobacterial community composition in soil suppressive or conducive to tobacco black root rot disease. *The International Society for Microbial Ecology ISME Journal* 3(2009) 1127–1138.
49. Gómez-Lama Cabanás, C.; Ruano-Rosa, D.; Legarda, G.; Pizarro-Tobías, P.; Valverde-Corredor, A.; Triviño, J. C.; Roca, A.; Mercado-Blanco, J. Bacillales members from the olive rhizosphere are effective biological control agents against the defoliating pathotype of *Verticillium dahliae*. *Agriculture*. 8, 90(2018)1-23.
50. Janik, P.; Zawisza, B.; Talik, E.; Sitko, R. Selective adsorption and determination of hexavalent chromium ions using graphene oxide modified with amino silanes. *MicrochimicaActa* (2018) 185: 117.

Please cite this Articles:

Oulebsir-Mohandkaci H., Tihar-Benzina F., Ait Belkacem C., Belgrade A. N., Recherche de molécules bioactives d'intérêt à partir d'une collection de souches bactériennes rhizosphériques et étude de leur effet antifongique, *Algerian J. Env. Sc. Technology*, 6:3(2020) 1457-1465