

**AFPP – ONZIÈME CONFÉRENCE INTERNATIONALE SUR LES MALADIES DES PLANTES
TOURS – 7 AU 9 DÉCEMBRE 2015**

**ÉTUDE COMPARATIVE DE L'ÉVALUATION DE L'ACTIVITÉ ANTIFONGIQUE DE SOUCHES
BACTÉRIENNES *IN VITRO***

S. MEZAACHE-AICHOURE⁽¹⁾, N. HAICHOURE⁽¹⁾, N. BOULEKFOUF⁽¹⁾, M. LAHRECHE⁽¹⁾ et M.M. ZERROUG^{(1)*}

⁽¹⁾ LMA DÉPARTEMENT DE MICROBIOLOGIE, FACULTÉ SNV, UNIVERSITÉ FERHAT ABBAS SÉTIF 1 (EL BEZ), SÉTIF 19000, ALGÉRIE. MÉL *: med.zerroug@gmail.com

RÉSUMÉ

Ce travail vise à comparer deux méthodes évaluant l'activité antifongique de 15 isolats bactériens appartenant aux genres *Pseudomonas* et *Bacillus*. L'isolat XI47 a donné une inhibition de 71% envers les trois champignons phytopathogènes testés par la méthode de confrontation. Par contre, par la méthode d'Ownley, c'est l'isolat XI29 qui a donné le pourcentage d'inhibition le plus élevé, avec 40 et 19% vis-à-vis de *Fusarium solani* var. *coeruleum* et *Phytophthora infestans* respectivement.

Mots clés : Bactéries antagonistes, antagonisme, champignons phytopathogènes.

ABSTRACT

COMPARATIVE STUDY OF EVALUATION THE *IN VITRO* BACTERIAL STRAINS ANTIFUNGAL ACTIVITY

This work aims to compare two methods of evaluating the antifungal activity of 15 bacterial isolates belonging to *Pseudomonas* and *Bacillus*. The XI47 isolate gave an inhibition of 71% to the three plant pathogenic fungi tested, by the confrontation method. In contrast by the method Ownley is the XI29 isolate which gave the highest percentage of inhibition, with 40 and 19% vis-a-vis of *Fusarium solani* var. *coeruleum* and *Phytophthora infestans* respectively.

Key words: Antagonistic bacteria, antagonism, phytopathogenic fungi.

INTRODUCTION

Le sol et la rhizosphère constituent une niche écologique pour beaucoup de microorganismes. Parmi ces microorganismes, on retrouve ceux dont la présence dans le sol peut nuire au bon développement de la plante tandis que d'autres, au contraire, lui sont bénéfiques. Beaucoup de chercheurs rapportent que parmi ces micro-organismes, les bactéries constituent le groupe le plus important, quantitativement et qualitativement par le rôle que peuvent jouer certaines d'entre elles dans les équilibres biologiques, aussi bien contre les pathogènes des cultures que les saprophytes du sol nuisibles aux plantes, contribuant ainsi à la promotion de la croissance et du développement de la plante.

Au niveau de la rhizosphère et du contrôle des agents pathogènes telluriques, la protection se fait principalement via des bactéries appartenant aux genres *Streptomyces*, *Bacillus*, *Agrobacterium* et *Pseudomonas* et des champignons des genres *Ampelomyces*, *Candida* et *Trichoderma*. La majorité des études montrent que de 1 à 10% des isolats du sol peuvent avoir un certain pouvoir antagoniste *in vitro*, mais de ce nombre, très peu a la capacité de supprimer les agents phytopathogènes dans divers sols et conditions de croissance et encore un plus petit nombre encore est capable d'inhiber un large spectre d'espèces pathogènes (McSpadden Gardener et Fravel, 2002).

L'objectif de ce travail est d'évaluer l'activité antagonique des souches bactériennes contre trois champignons phytopathogènes telluriques responsables de fusariose *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis* de pourriture *Fusarium solani* var. *coeruleum*, et du mildiou *Phytophthora infestans*.

MATERIEL ET MÉTHODES

MATERIEL BIOLOGIQUE

Agents fongiques et bactériennes de références

Les souches de champignons testés sont *Phytophthora infestans* (Pr Larous, LMA, département de microbiologie, Université Sétif-1-), *Fusarium oxysporum* F.sp *albedinis* (INRAA, Alger), *Fusarium solani* var. *Coeruleum* (Institut Pasteur de Paris).

Les souches bactériennes *Pseudomonas fluorescens* (CHA0) et *Pseudomonas auréofaciens* (30-84) (Pr Haas, Lausanne, Suisse), la souche *Pseudomonas chlororaphis* sub sp. *Auréofaciens* (2).

Agents antagonistes

Les agents antagonistes utilisés dans le test de l'antagonisme ont été isolés précédemment (Belatrous, 2011; Sayah, 2011) et identifiés par Mansouri et Remadna (2013): Xi29, Xi48, Xi49, Xi47, B5, B21, Xi35', Xi29', Xi37', Xi30, Xi12, Xi1.

METHODES

Méthodes d'étude de l'activité antifongique

L'activité antagoniste des souches bactériennes est étudiée selon deux méthodes, la méthode de confrontation champignon/bactérie et la méthode d'Ownley.

Méthode de confrontation champignon/bactérie

La bactérie estensemencée par stries parallèles sur une moitié de la boîte Pétri (Les souches testées sont préalablement cultivées pendant la nuit dans du milieu Nutrient broth yeast extract (NBY) à 28°C). Sur l'autre moitié, un disque de champignon de 5 mm de diamètre, obtenu d'une culture d'une semaine sur milieu Pomme de terre dextrose agar (PDA), est déposé à 1 cm du bord. (Le disque est placé suivant un axe diamétral équidistant des bactéries). Alors que les boîtes témoins ne contiennent que le disque fongique. Les tests sont faits en triplicata, et les boîtes sont randomisées. La lecture est effectuée lorsque le champignon témoin a recouvert toute la boîte. On mesure alors le rayon de croissance du champignon dans les boîtes tests et on calcule le pourcentage d'inhibition selon la formule (Sy, 1976).

$$IC(\%) = \frac{Dt - D_{pa}}{Dt} \times 100$$

D_t : croissance diamétrale du témoin.

D_{pa} : croissance diamétrale mycélienne du pathogène en présence de l'antagoniste.

Méthode D'Ownley

La deuxième méthode utilisée est celle décrite par Ownley *et al* (1990). Le disque fongique est cette fois placé au centre de la boîte, alors que 2µl de la bactérie à tester ainsi que les souches références sont déposées à 2 cm en face du disque fongique. (Les souches testées sont préalablement cultivées pendant la nuit dans du NBY à 28°C).

Les témoins ne contiennent que le disque fongique. Les tests sont faits en triplicata, et les boîtes sont randomisées. Lorsque le champignon de la boîte témoin a recouvert le milieu de culture, on calcule le pourcentage d'inhibition selon la formule :

$$I(\%) = \frac{IN1}{T1} - \frac{IN2}{T2} \times 100 \text{ (Ownley et al, 1990).}$$

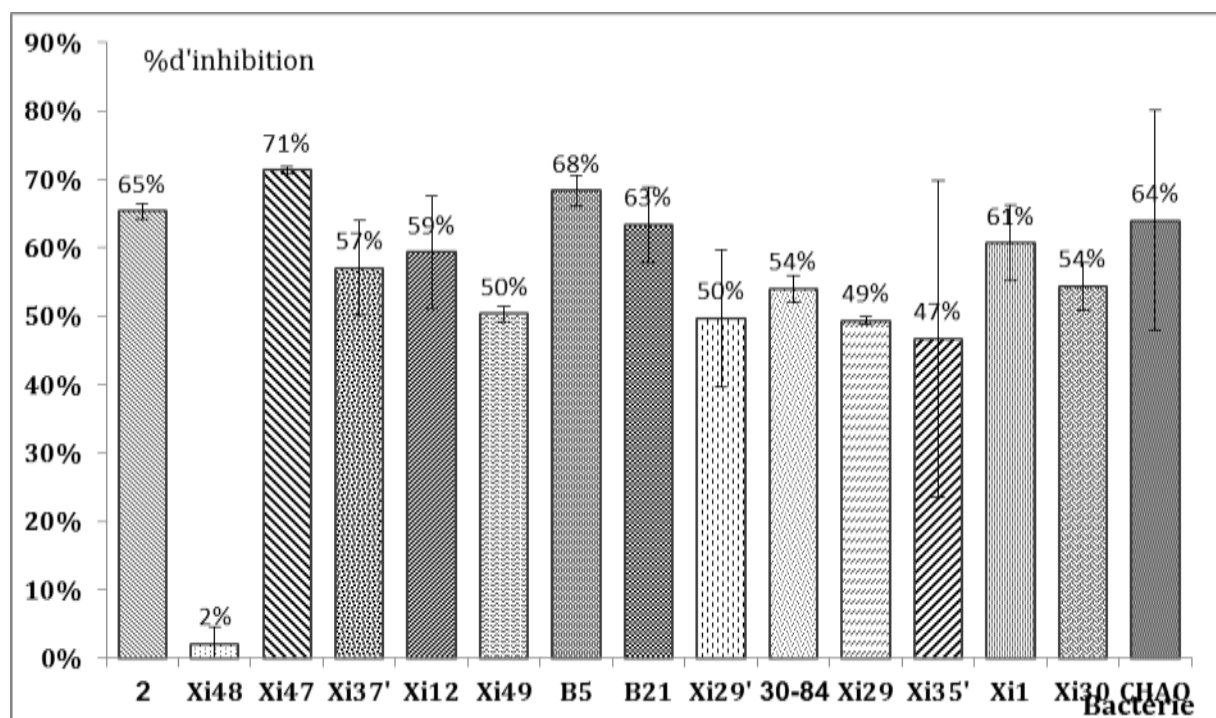
RESULTATS

METHODE DE CONFRONTATION CHAMPIGNON/BACTERIE

Après une incubation de 24 jours le pourcentage d'inhibition pour *Fusarium solani var.coeruleum* a varié entre 2% pour l'isolat XI48, et 71% pour l'isolat XI47. Alors que pour les souches de référence CHAO, Souche 2 et 30-84 on a obtenu respectivement 64%, 65% et 54% (Figure 1).

Figure 1 : Evaluation de l'effet antifongique des souches bactériennes contre le champignon *Fusarium solani var.coeruleum* en confrontation après 24 jours.

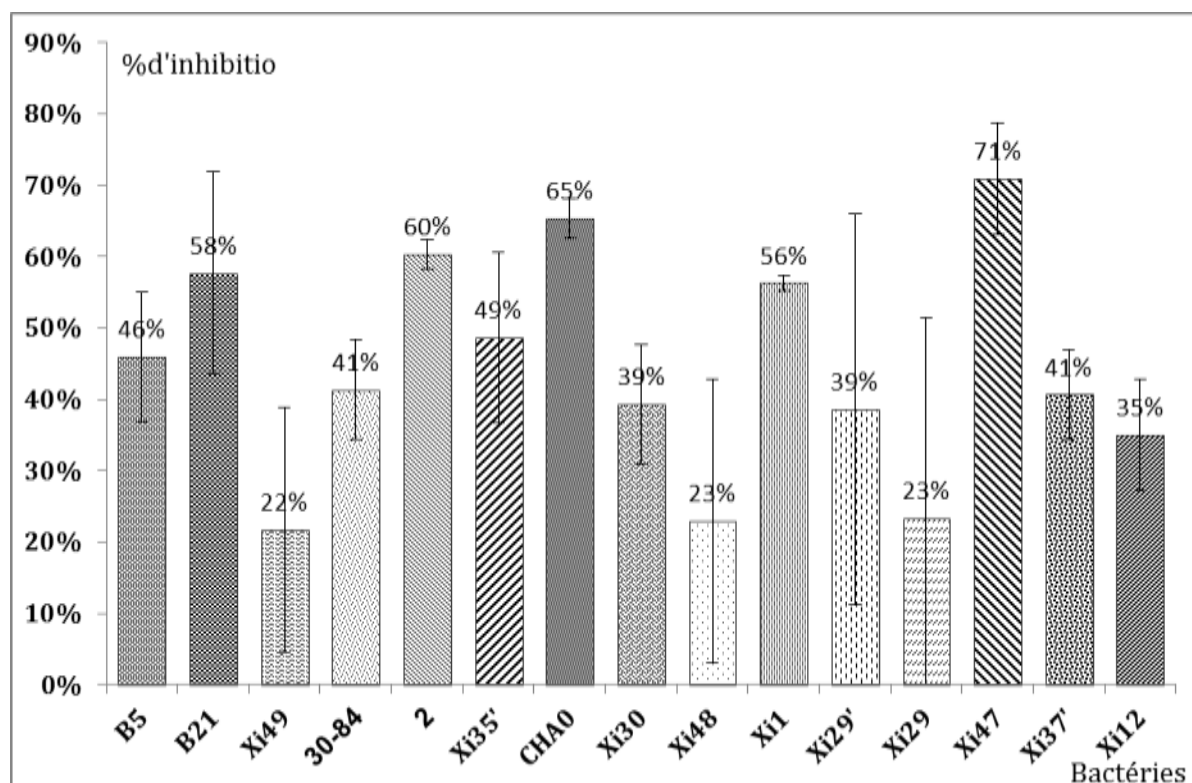
Antifungal activity of bacterial strains against *Fusarium solani var.coeruleum* after 24 days of confrontation



Après une incubation de 19 jours, le pourcentage d'inhibition pour *Phytophthora infestans* varie entre 23% pour les deux isolats XI29, XI48, et 71% pour l'isolat XI47. Alors que pour les souches de référence CHA0, Souche 2 et 30-84 on a obtenu respectivement 65% ,60% et 41% (Figure 2).

Figure 2. Effet antifongique des souches bactériennes contre le champignon *Phytophthora infestans* en confrontation après 19 jours

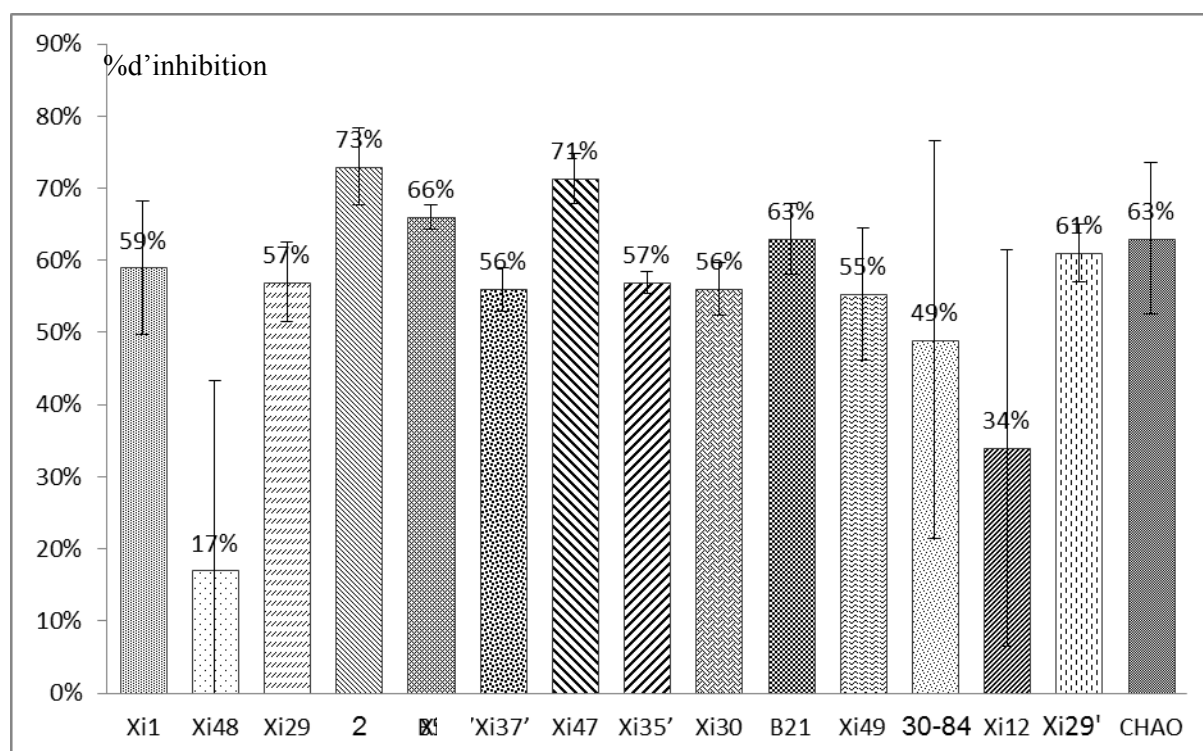
Antifungal activity of bacterial strains against *Phytophthora infestans* after 19 days of confrontation



Après une incubation de 30 jours le pourcentage d'inhibition pour *Fusarium oxysporum fsp albedinis* varié entre 17% pour l'isolat XI48, et 71% pour l'isolat XI47. Alors que pour les souches de référence CHA0, souche 2 et 30-84 on a obtenu respectivement : 63% ,71% 49% (Figure 3).

Figure 3. Effet antifongique des souches bactériennes contre le champignon *Fusarium oxysporum* f.sp.*albedinis* en confrontation après 19 jours.

Antifungal activity of bacterial strains against after *Fusarium oxysporum* f.sp.*albedinis* 19 days of confrontation



La compétence rhizosphérique des *Pseudomonas* et *Bacillus* varie d'une souche à l'autre. Il apparaît que la souche Xi47 est la plus active par rapport aux autres souches, avec l'activité la plus élevée. Elle a inhibé la croissance mycélienne des trois champignons à pourcentage 71%.

L'antagoniste des autres souches est inférieur à celui de la souche Xi47 et le pourcentage d'inhibition varie entre (2% et 68%).

METHODE D'OWNLEY

Après une incubation de 18 jours le pourcentage d'inhibition pour *Fusarium solani* var *coeruleum* a varié entre 7% pour l'isolat Xi37', et 40% pour l'isolat Xi29 (Figure 4).

Après une incubation de 18 Jours le pourcentage d'inhibition pour *Phytophthora infestans* a varié entre 3% pour l'isolat Xi1, et 19% pour l'isolat Xi29 (Figure 5).

Après une incubation de 16 jours le pourcentage d'inhibition *Fusarium oxysporum* F.sp *albedinis* varié entre 7% pour l'isolat Xi1, et 34% pour l'isolat B5 (Figure6).

Figure 4. Effet antifongique des souches bactériennes contre le champignon *Fusarium solani* var.*coeruleum* par la méthode d'Ownley après 18 jours.

Antifungal activity of bacterial strains against *Fusarium solani* var.*coeruleum* after 18 days using Ownley method.

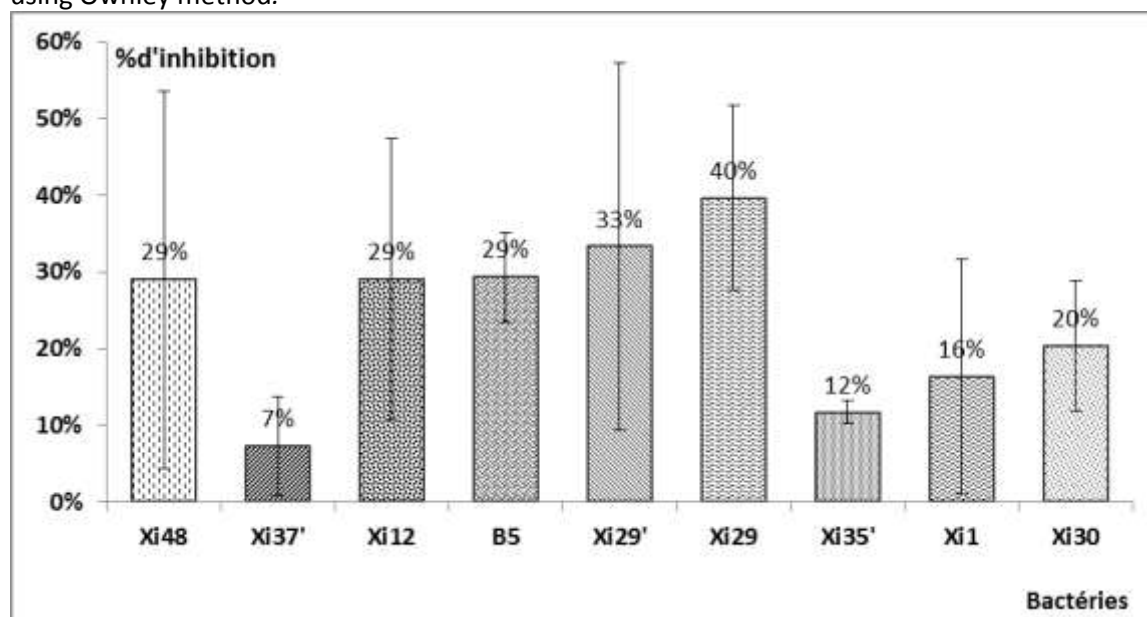


Figure 5. Effet antifongique des souches bactériennes contre le champignon *Phytophthora infestans* par la méthode d'Ownley après 18 jours.

Antifungal activity of bacterial strains against *Phytophthora infestans* after 18 days using Ownley method.

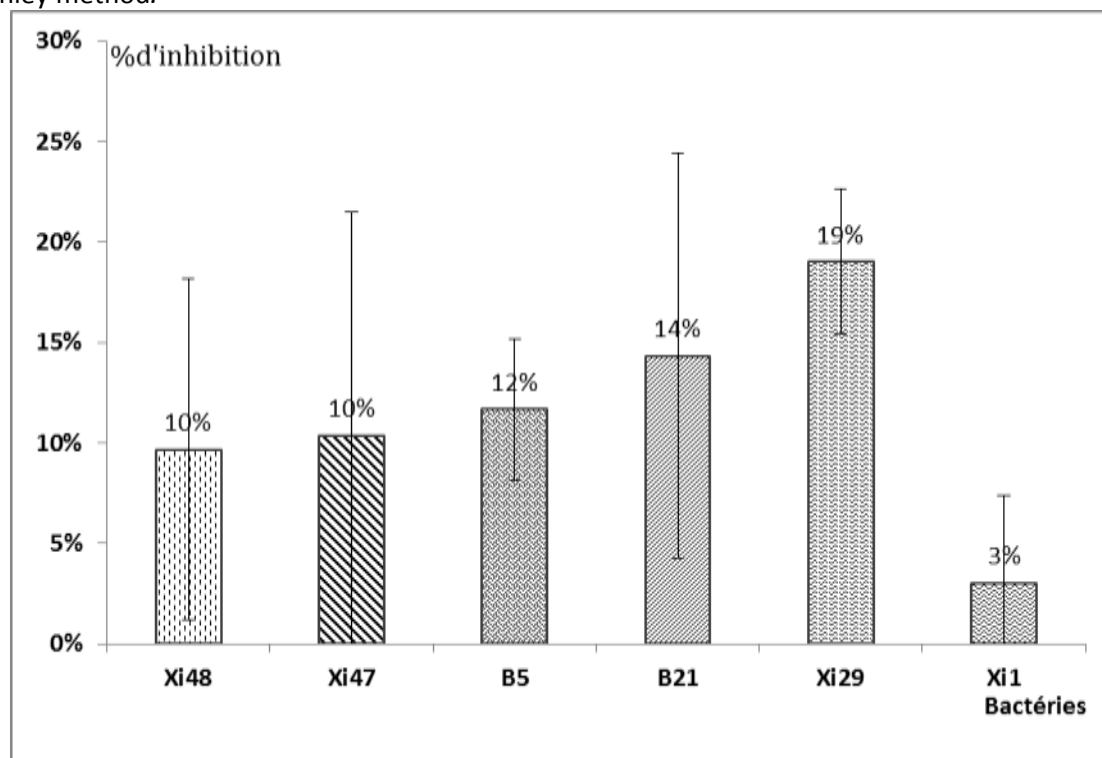
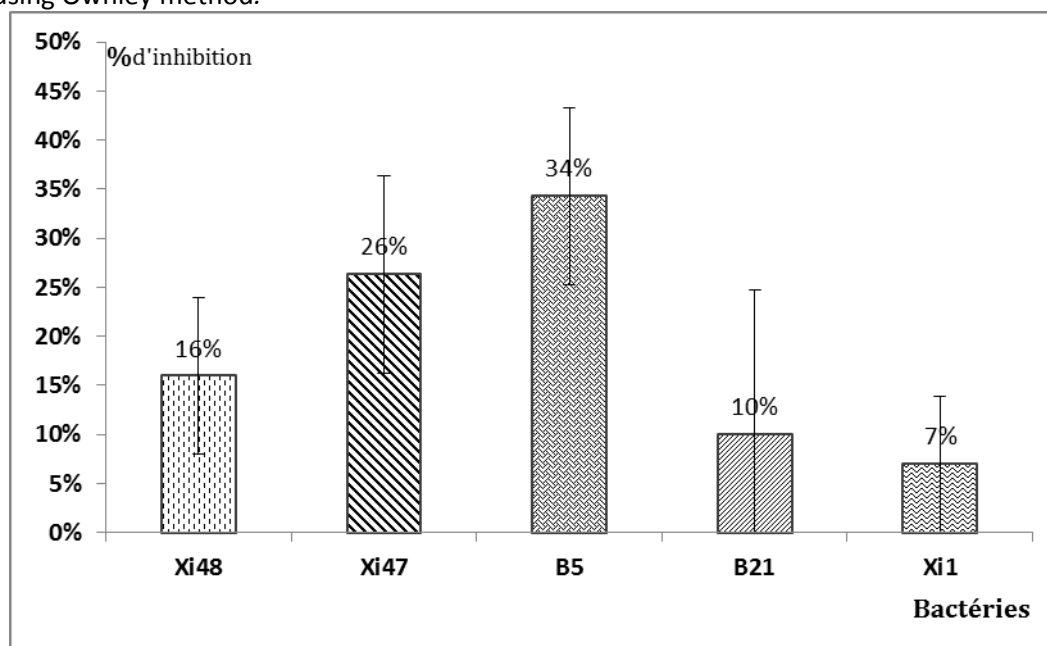


Figure 6. Effet antifongique des souches bactériennes contre le champignon *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis* par la méthode d'Ownley après 16 jours.

Antifungal activity of bacterial strains against *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis* after 16 days using Ownley method.



Dans le cas de la deuxième méthode (méthode Ownley), le meilleur résultat ont été obtenus avec la souche XI29 avec un pourcentage d'inhibition de 40%-19% pour les deux champignons respectivement : *Fusarium solani* var. *coeruleum* et *Phytophthora infestans*, et le meilleur résultat on été obtenus avec la souche B5 avec un pourcentage d'inhibition 34% pour le champignon : *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis*.

DISCUSSION

La rhizosphère s'avère comme un habitat riche en microorganismes pouvant être exploités pour l'isolement et la sélection de bactéries antagonistes capables de coloniser efficacement les systèmes racinaires influençant ainsi de manière bénéfique la plante en stimulant sa croissance et/ou en la protégeant contre des infections par des champignons phytopathogènes. Les bactéries appartenant aux genres *Bacillus* et *Pseudomonas* présentent un intérêt particulier, beaucoup de recherches se sont concentrées sur ces deux genres bactériens parce qu'ils sont des habitants communs de la rhizosphère et possèdent une grande activité dans le contrôle biologique de maladies causées par des champignons phytopathogènes. Les bactéries de la rhizosphère protègent les racines de la plante contre les microorganismes pathogènes par des effets compétitifs directs et la production de substances antimicrobiennes et ont une influence sur la croissance de la plante (Ludueno *et al.*, 2012). Les résultats présentés ici montrent que les bactéries de genres *Bacillus* et *Pseudomonas* inhibent la croissance des trois champignons phytopathogènes. Cette inhibition pourrait être liée à la production métabolites secondaires. En effet, selon (Kyselková et Moenne-Loccoz, 2012), les bactéries antagonistes produisent des métabolites secondaires tels le 2,4-diacétylphloroglucinol (DAPG), les phénazines, le cyanure d'hydrogène (HCN), pyrrolnitrine, pyolutéorine, des lipopeptides,... De plus, les *Bacillus* peuvent produire diverses toxines et provoquer également la lyse des spores de champignons (Fuchs, 1999).

Il apparait que la souche Xi47 (*Bacillus subtilis*) est la souche la plus active., En effet, *Bacillus subtilis* produit plusieurs classes d'antibiotiques lipopeptidiques à large spectre d'action. Ces produits sont très efficaces *in vitro* et *in vivo* contre plusieurs agents phytopathogènes comme *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, *Magnaporthe oryzae*, *Sclerotinia sclerotiorum*,

Cladophialophora carrionii, *Fusarium* spp., *Eutypa lata*, *Fusarium oxysporum*, *Alternaria burnsii*, *Chrysosporium indicum*, *Rhizoctonia bataticola*, *Botrytis cinerea*, *Penicillium digitatum* et *Rhizoctonia Solani*. Le pourcentage similaire d'isolat antagonique Xi 47 a été rapporté par (Zangoei *et al.*, 2014). Le champignon phytopathogène *F. oxysporum* est très sensible à *B. subtilis*, qui cause également des déformations mycéliennes et une croissance irrégulière (Shan *et al.*, 2013). Plusieurs espèces de *Pseudomonas* ont montré activité antagonistique vis-à-vis des champignons phytopathogènes.

L'activité antagoniste des *Pseudomonas* spp. fluorescents est due à leur capacité à produire des métabolites actifs contre des agents phytopathogènes tel que le 2,4-diacetylphloroglucinol (2,4-DAPG) qui est un antibiotique large spectre (Keel *et al.*, 1992) et les phénazines (Haas et Defago, 2005). Les souches *P. fluorescens* qui produisent (2,4-DAPG) sont des agents de biocontrôle fortement efficaces (Raaijmakers *et al.*, 2002; Weller *et al.*, 2007), et responsables de suppressions naturelles de certains pathogènes tels que *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. (Weller *et al.*, 2007). Les phénazines, analogues des flavines (Coenzymes), par exemple inhibent le transport des électrons. Elles peuvent aussi libérer des radicaux libres en présence de pyochéline chargée en ions ferreux qui causeront des dommages aux lipides et autres macromolécules. Pour sa part, le DAPG cause des dommages aux membranes de *Pythium* spp. et inhibe fortement la germination des zoospores de cet oomycète. Le cyanide d'hydrogène produit également par les *P. fluorescens* et peut inhiber un grand nombre de métalloenzymes. Les lipopeptides produits par les *P. fluorescens* jouent le rôle de surfactants et peuvent s'insérer dans les membranes microbiennes causant d'importants dommages à certains microorganismes (Haas et Defago, 2005).

CONCLUSION

L'étude de l'effet antagonique des souches bactériennes appartenant aux genres *Bacillus* et *Pseudomonas* a montré que ces bactéries sont capables d'inhiber *in vitro* la croissance des champignons phytopathogènes tel que : *Phytophthora infestans*, *Fusarium oxysporum* f.sp.*albedinis*, *Fusarium solani* var.*coeruleum* ; surtout l'isolat Xi47 qui a une activité plus élevée que les autres souches. Cette étude permet encore une fois la mise en valeur de l'exploitation des bactéries des genres *Bacillus* et *Pseudomonas* dans le biocontrôle de différents champignons phytopathogènes.

REMERCIEMENTS

Les auteurs tiennent à remercier le Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique pour son soutien financier dans le cadre des programmes de recherche "CNEPRU N° F01220100022, F01220130088 et PNR 1 / u19 / 332".

BIBLIOGRAPHIE

- Belatrous Z., 2011- Contribution à l'étude des sols suppressif de la region de Ain oulmane. UFA Sétif
- Duijff B.J., Gianinazzi-Pearson V., Emanceau P., 1997- Involvement of the outer membrane lipopolysaccharides in the endophytic colonization of tomato roots by biocontrol *Pseudomonas fluorescens* strain WCS417r. *New Phytol* 135: 325–334.
- Fuchs J.G., 1999- Fertilité des sols : Les produits biologiques: bien les connaître pour mieux les utiliser, biophyt sa. Paris : AGREF-Formation ,pp:1-61.
- Haas D., and Defago G., 2005- Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonades, *Nature Reviews Microbio*. 3:307-319.
- Keel C., Schnider U., Maurhofer M., Voisard C., Burger D., Haas, D., Défago G., 1992- Suppression of root diseases by *Pseudomonas fluorescens* CHA0: importance of the bacterial secondary metabolite 2,4-diacetylphloroglucinol. *Molec.Plant- Microbe Interact* 5:4–13.
- Kiely P.D., Haynes J.M., Higgins C.H., Franks, A., Mark G.L., Morrissey J.P., O'Gara F., 2006- Exploiting newsystems-based strategies to elucidate plant-bacterial interactions in the rhizosphere. *Microb Ecol* 51: 257–266.

Kyselková M., Moenne-Loccoz Y., 2012- *Pseudomonas* and other microbes in disease –suppressive soils .In Lichtfouse E (dir.).*Organic fertilisation,soilQualityand Human Health*, pp:93-140.Springer.

Ludueno L.M.,Taurian T.,Tonelli M.L., Angelini J.G.,Anzuay M.S.,Valetti L., Muñoz V., Fabra A.I., 2012- Biocontrol bacterial communities associated with diseased peanut (*Arachis hypogaea* L.) plants. *E J Soil Biol* 53: 48-55, 2012.

Mansouri S., Remadna H., 2013- Identification de bacteries isolees de la rhizosphere. UFA Sétif Mémoire de master pp 25-35, 2013.

McSpadden Gardener B. B and Fravel D. R., 2002-Biological control of plant pathogènes: Research, commercialization, and application in the USA Online. *Plant Health Progress* 10:1-18.

Ownley B.H., Weller D.M., Alldredge R.J., 1990- Influence of soil edaphic on suppression of take-all by *Pseudomonasfluorescens* 2-79.(Abstr.) *Phytopathol* 80:995.

Raaijmakers J.M., Vlami M., de Souza J.T., 2002- Antibiotic production by bacterial biocontrol agents. *Antonie van Leeuwenhoek* 81:537–547.

Sayah N., 2011- Contribution à l'étude des sols suppressif de la région de Ain azel. UFA Sétif mémoire

Shan H., Zhao M., Chen D., Cheng J., Li J., Feng Z., Ma Z., An D., 2013- Biocontrol of rice blast by the phenaminomethylacetic acid producer of *Bacillus methylotrophicus* strain BC79. *Crop Protec* 44: 29-37.

Sy A.A., 1976 - Contribution à l'étude de *Pyriculariaoryzae*Cav.Recherche in vitro d'antagonistes dans une perspective de lutte biologique. Thèse Doct. Ingénieur INP Toulouse,pp :534,236 p.www.sist.sn/gsd/collect/publi/index/assoc/HASH8e42/a871ae70.dir/doc.pdf,.

Weller D.M., Landa B.B., Mavrodi O.V., Schroeder K.L., De La Fuente L., Blouin- Bankhead S., Allende-Molar R., Bonsall R.F., Mavrodi D.V., Thomashow L.S., 2007- Role of 2,4-diacetylphlor-ogluinol-producing fluorescent *Pseudomonas* spp.In the défense of plant roots. *Plant Biol* 9: 4–20.

Zangoei E.H., Etebarian R., Sahebani N., 2014- Biological control of apple gray mold by mixtures of *Bacillus Subtilis* and yeast isolates . *Afric J Food Scie* 8(3):155-163.