

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

ACTIVITE ANTIFONGIQUE DE METABOLITES DE SOUCHES BACTERIENNES

N. HAICHOIR⁽¹⁾ *, S. MEZAACHE-AICHOIR⁽¹⁾, A. BOUABDALLAH⁽¹⁾ et M.M. ZERROUG⁽¹⁾

⁽¹⁾ LMA DEPARTEMENT DE MICROBIOLOGIE, FACULTÉ SNV, UNIVERSITÉ FERHAT ABBAS SÉTIF 1(EL BEZ), SÉTIF 19000, ALGÉRIE. MÉL *: haichournora@yahoo.fr

RÉSUMÉ

Le but de notre travail est de tester l'activité antifongique d'extraits bactériens. Les extraits de 15 souches ont été testés par la méthode de diffusion sur disque. Les zones d'inhibition varient entre 0 et 18.5mm vis-à-vis de *Fusarium solani* var. *coeruleum* (Fsc), 7 et 11.33mm vis-à-vis de *Fusarium oxysporum* fsp. *albedinis* (Foa) et 0 et 19.66mm vis-à-vis de *Phytophthora infestans* (Pi). Alors que la souche de référence CHA0 n'a donné que 8.66mm vis-à-vis du Foa.

Mots-clés : antagonisme, extrait bactérien, champignon phytopathogène, inhibition.

ABSTRACT

ANTIFUNGAL ACTIVITY OF METABOLITS OF BACTERIAL STRAINS

The aim of our work is to test antifungal activity of bacterial extracts. Extracts of 15 strains were tested by disk diffusion method. The inhibition zones ranging from 0 to 18.5mm against *Fusarium solani* var. *coeruleum* (Fsc), 7 to 11.33mm against *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* (Foa) and 0 to 19.66mm and vis-a-vis of *Phytophthora infestans* (Pi). While CHA0 reference strain gave only 8.66mm against the Foa.

Keywords: antagonism, bacterial extract, phytopathogenic fungi, inhibition.

INTRODUCTION

La protection biologique fait intervenir l'utilisation des organismes vivants, leurs produits, leurs gènes ou les produits de leurs gènes, pour lutter contre les organismes nuisibles ou favoriser la croissance des organismes favorables (Cook *et al.*, 1987). Le concept du biocontrôle est devenu de plus en plus populaire, non seulement à cause de l'augmentation de l'inquiétude mondiale de l'environnement et l'utilisation des pesticides chimiques, mais aussi à cause de l'inefficacité des méthodes actuelles de lutte contre les champignons phytopathogènes (Cook, 1993; Tofazzal et von Tiedemann, 2011).

La production de métabolites antifongiques revêt une importance particulière dans la protection biologique (Haas and Défago, 2005). Parmi les métabolites qui possèdent ce pouvoir antifongique, il existe ceux produits par *Pseudomonas*, tels que : les phenazines, phloroglucinols, pyoluteorines, pyrrolnitrines, lipopeptides cycliques et le cyanure d'hydrogène (Haas and Défago, 2005 ; Price-Whelan *et al.*, 2006 ; Schouten *et al.*, 2008).

L'objectif de notre étude est de tester le pouvoir antagoniste de filtrats de quelques souches bactériennes appartenant au genre *Pseudomonas* et *Bacillus* vis-à-vis de suspensions sporales de quelques champignons phytopathogènes telluriques : *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis*, *Fusarium solani* var. *coeruleum* et *Phytophthora infestans*.

MATERIEL ET MÉTHODE

1- MATERIEL BIOLOGIQUE

Les champignons phytopathogènes testés sont *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis* (Foa), *Fusarium solani* var. *Coeruleum* (Fsc) et *Phytophthora infestans* (Pi) amicalement fournies par Pr. Larous, LMA, Département de microbiologie, Université Sétif 1, l'INRAA d'Alger et l'Institut Pasteur de Paris, France respectivement.

Les souches bactériennes de référence sont CHA0 (*Pseudomonas protegens* sp-nov), la souche 30-84 (*Pseudomonas auréofaciens*) (Pr Haas, Lausanne, Suisse) et la souche 2 (*Pseudomonas chlororaphis* sub sp. *aureofaciens*) (Dr Mezaache-aichour, LMA Département de microbiologie, Université Sétif 1). Les bactéries utilisées pour les tests d'antagonisme ont été précédemment isolées par (Belatrous, 2011 ; Sayah, 2011) et identifiées par Mansouri et Remadna (2013) : Xi29, Xi48, Xi49, Xi47, B5, B21, Xi35', Xi29'inh, Xi37', Xi30, Xi12, Xi1.

2- PREPARATION DES EXTRAITS BACTERIENS

Les souches bactériennes de référence ainsi que les souches à tester, préalablement régénérées sur BN (Bouillon nutritif), sont cultivées dans 25 ml de NBY (Nutrient Broth Yeast Extract) pendant 72h sous agitation permanente à température ambiante. Après mesure de la densité optique pour déterminer la charge en bactéries productrices de substances antifongiques, les cultures bactériennes sont centrifugées pendant 20 mn à 5600 rpm, filtrées à travers des membranes de 0.45µm de porosité, les filtrats étant récupérés dans des flacons stériles.

3- PREPARATION DES SUSPENSIONS SPORALES ET DENOMBREMENT DES SPORES FONGIQUES

Les spores fongiques sont récupérées par addition de 10 ml d'eau distillée stérile sur des cultures fongiques (Foa, Fsc et Pi) de plus d'un mois ; la surface est raclée avec un râtelier stérile, et la suspension est alors récupérée dans des flacons stériles qui sont incubés pendant 4 heures au réfrigérateur pour stimuler la germination des spores (Ebstrup *et al.*, 2005).

Pour le dénombrement des spores, après agitation de la suspension sporale, l'échantillon est déposé à l'aide d'une pipette Pasteur sur une lame ; cette dernière est couverte d'une lamelle. La lame préparée est dénombrée sous le microscope après trois minutes pour permettre aux spores fongiques de se déposer.

4- ETUDE DE L'EFFET ANTIFONGIQUE DES EXTRAITS BACTERIENS

Pour tester l'activité anti fongique, un triplicata de disques imprégnés de 20 µl d'extraits bactériens est préparé pour chacune des bactéries à tester contre chacun des champignons (Foa, Fsc et Pi). Ces disques sont ensuite déposés sur une boîte de Pétri contenant le milieu PDA (Potatoes Dextrose

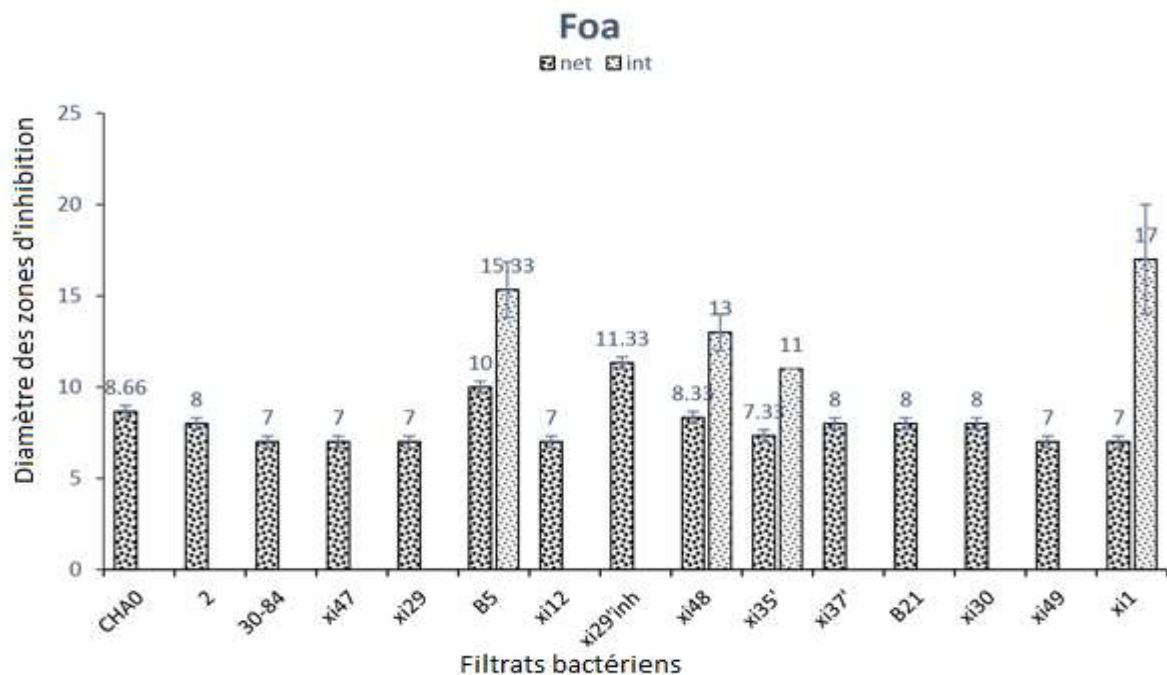
Agar) et ensemencée par inondation en utilisant la suspension sporale. Un disque imprégné de NBY sert de contrôle négatif et des disques imprégnés de fongicides (Vapcotp à 10g/l, Curitine à 20g/l et Kazir à 1g/l) servent de contrôles positifs. Une boîte de PDA ensemencée par la suspension sporale, ne recevant aucun disque, sert de témoin. Les boîtes sont alors incubées à l'obscurité à température ambiante pendant quatre jours, les diamètres des zones d'inhibition sont mesurés pour déterminer l'antifongique des extraits des bactéries testées.

RESULTATS

1- INHIBITION DU FOA PAR LES FILTRATS BACTERIENS

Deux filtrats ont montré une zone d'inhibition nette, il s'agit de ceux des isolats Xi29'inh et B5 avec respectivement 11,33 et 10mm. Alors, que les autres filtrats ont montré un effet moins important avec des zones nettes variant entre 7 et 8 mm (Figure 1). D'autre part, les filtrats des isolats Xi1, B5, Xi48 et Xi35'ont montré à côté de zones nettes des zones intermédiaires de 17, 15.33, 13 et 11mm respectivement. Concernant ceux des souches de référence CHA0, 2 et la souche 30-84, ils ont montré des zones nettes de 8.66, 8 et 7 mm respectivement.

Figure 1 : Activité des filtrats bactériens contre *Fusarium oxysporum f.sp. albedinis*
(Bacterial filtrates activity against *Fusarium oxysporum f.sp. albedinis*)

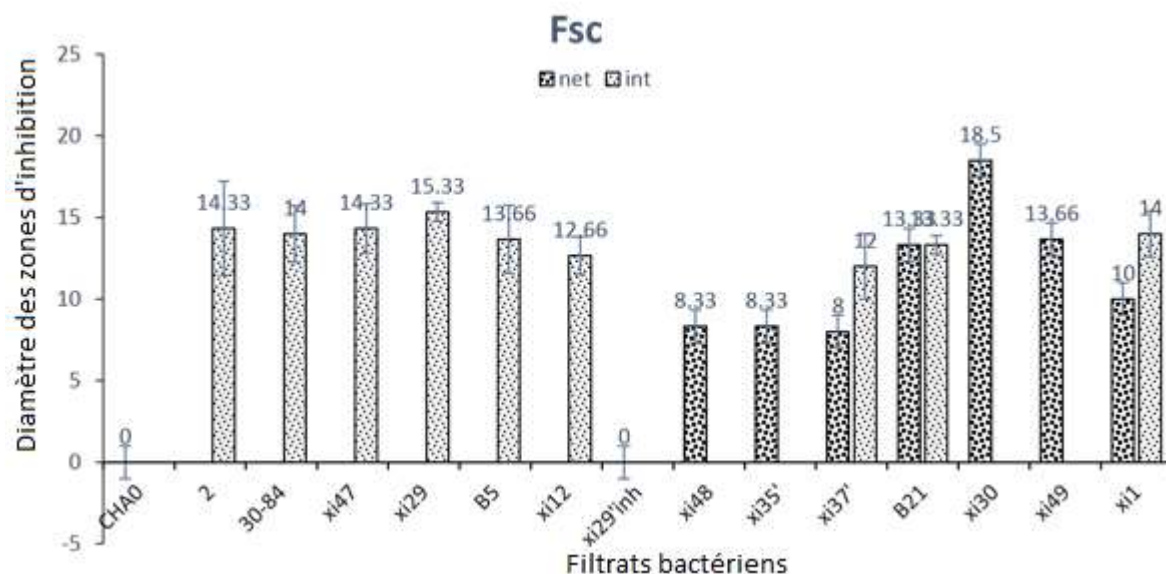


Xi1, B5...: isolats bactériens testés ; CHA0, souche 2 et 30-84: souches de référence ; net: nette, int : intermédiaire.

2- INHIBITION DE FSC PAR LES EXTRAITS BACTERIENS

La plus importante zone d'inhibition est obtenue avec le filtrat de la souche Xi30 avec un diamètre de 18,5mm. En effet, cette inhibition est variable en allant vers des valeurs de 6mm (diamètre du disque) pour certains filtrats tels que celui de Xi29'inh (*Pseudomonas* sp.) (Figure 2). Toutefois, une inhibition intermédiaire a été observée avec les filtrats des isolats : Xi29, Xi47, B5, et Xi12 avec des diamètres de 15.33, 14.33, 13.66 et 12.66mm respectivement. Alors que pour les filtrats des souches de référence des zones intermédiaires de 14.33 et 14 mm ont été obtenues avec les extraits des souches 2 et 30-84 respectivement, alors que pour celui de la souche CHA0 aucune zone n'a été observée.

Figure 2 : Activité antifongique des filtrats bactériens vis-à-vis de *Fusarium solani* var. *coeruleum*
(Antifungal activity of bacterial filtrates against *Fusarium solani* var. *coeruleum*)

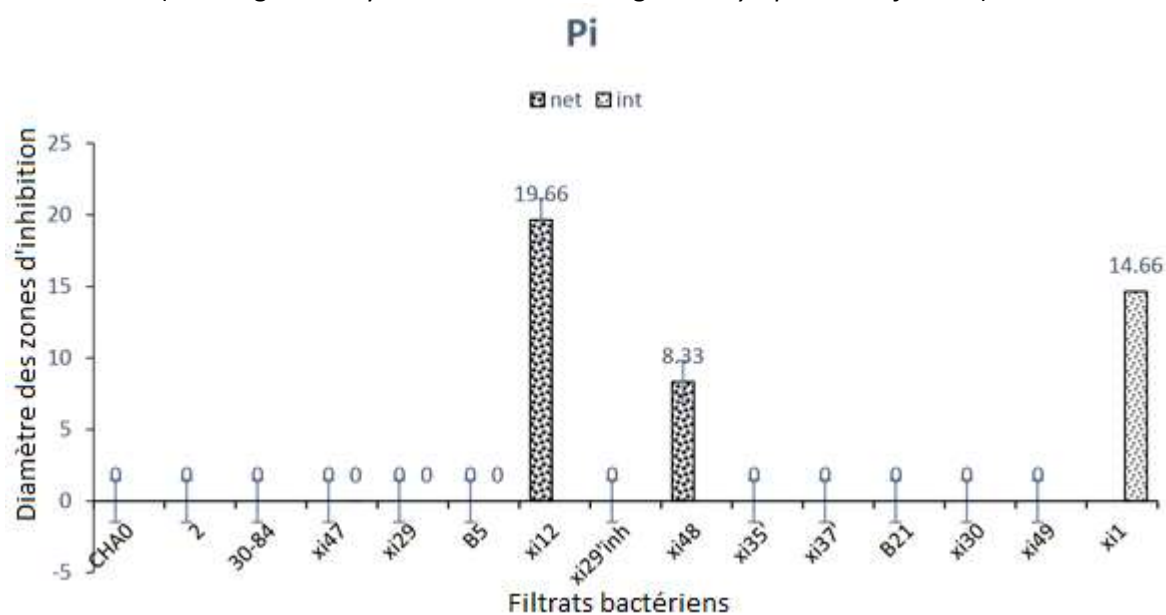


Xi1, B5: isolats bactériens testés ; Cha0, souche 2 et 30-84 : souches de référence. net : nette, int : intermédiaire.

3- INHIBITION DES SPORES DE *PI* PAR LES EXTRAITS BACTERIENS

Seuls les filtrats des trois souches : Xi48 et Xi12 ont montré des zones d'inhibition nettes de : 8.33 et 19.66mm respectivement, alors que celui de Xi1a donné une zone intermédiaire de 14.66 mm (Figure 3). Les extraits des souches de référence CHA0, 2 et 30-84 n'ont montré aucune zone d'inhibition.

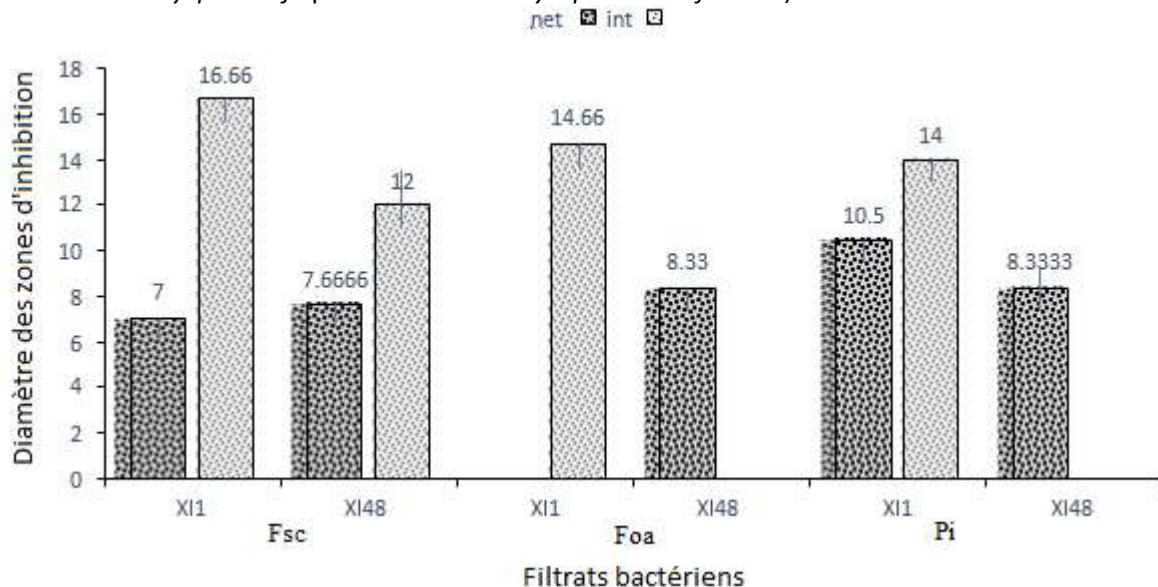
Figure 3 : Activité des filtrats bactériens contre *Phytophthora infestans*
(Antifungal activity of bacterial filtrates against *Phytophthora infestans*)



Xi1, B5 ... : isolats bactériens testés ; Cha0, souche 2 et 30-84 : souches de référence net : nette, int : intermédiaire.

D'après ces résultats, on déduit que les deux souches Xi48 et Xi1 sont les plus efficaces contre les trois champignons étudiés (Figure 4). L'extrait de Xi48 a montré une zone nette de 8.33 mm, par contre celui de Xi1 a montré une zone intermédiaire de 14.66 mm avec le Foa, et des zones nettes de 7.66 et 7 mm respectivement avec le Fsc. Par contre avec le Pi ils ont montré des zones nettes de 8.33 et 10.5 mm respectivement.

Figure 4 : Activité des filtrats Xi1 et Xi48 contre *Fusarium solani* var. *Coeruleum*, *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis* et *Phytophthora infestans*.
(Xi1 and Xi48 filtrates activity against *Fusarium solani* var. *Coeruleum*, *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis* and *Phytophthora infestans*).



Xi1 et Xi48 : les extraits bactériens ayant montré les plus grandes zones d'inhibition ; net : nette, int : intermédiaire.

Les filtrats des souches de référence semblent agir de la même manière avec les trois champignons étudiés. En effet, CHA0, 2 et 30-84, ont donné des zones nettes très proches de 8.66, 8 et 7 mm respectivement vis-à-vis du Foa. Par contre, les zones obtenues avec le Fsc et le Pi sont intermédiaires, avec cependant une absence d'activité de l'extrait de CHA0.

DISCUSSION

Les bactéries PGPR (plant growth promoting rhizobacteria) améliorant la croissance des plantes sont des bactéries du sol capables d'inhiber les organismes telluriques nuisibles et participent dans la stimulation de la croissance de certaines plantes par la production d'une variété de substances régulatrices dans la rhizosphère. Ces PGPR agissent de façon directe en facilitant la croissance des plantes soit par production ou solubilisation de substances favorisant le développement des plants (azote, phosphore, sels minéraux essentiels,...), soit en augmentant le taux des hormones chez la plante ; ou indirectement, par la diminution des effets inhibiteurs des organismes phytopathogènes ou de leurs produits.

Les bactéries appartenant au genre des *Pseudomonas* spp. et *Bacillus* possèdent la capacité de sécréter des substances telles les phenazines, phloroglucinol, pyoluteorines, pyrrolnitrines, lipopeptides cycliques et le cyanure d'hydrogène qui inhibent la croissance de certaines espèces fongiques (Haas and Défago, 2005 ; Price-Whelan, 2006 ; Schouten *et al.*, 2008). Les filtrats bactériens testés ont montré des résultats intéressants contre les trois champignons étudiés, mais ils varient d'un champignon à un autre, et d'un extrait à un autre. Parmi les filtrats testés, seuls Xi1 (*Bacillus licheniformis*) et Xi48 (*Pseudomonas*) ont montré des effets positifs avec les trois champignons (Foa, Fsc et Pi) à la fois. Cependant, leurs effets n'étaient pas très importants (des zones d'inhibition de 8mm). Ceci peut être dû aux faibles concentrations des substances actives

puisque les volumes des filtrats sont seulement de 20µl/disque. Les autres filtrats y compris ceux des souches de référence, ont montré des effets moins importants avec des zones d'inhibition comprises entre 7 et 8mm, ceci est peut-être dû, encore une fois, à la faible quantité des substances actives utilisées par rapport aux concentrations des suspensions sporales utilisées (74×10^6 spores/ml).

Concernant le Foa, les filtrats des souches B5 (*Bacillus mégathérium*) et Xi29'inh (*Pseudomonas* sp.) ont eu le plus grand effet parmi les extraits testés, avec des zones d'inhibition de 10 et 11.33 mm respectivement.

Pour le Fsc, les filtrats des souches Xi30 (*Pseudomonas* sp.), Xi49 (*Bacillus* sp.) et Xi1 (*Bacillus licheniformis*), ont été les plus efficaces avec des zones de 16.5, 13.66 et 10.5mm respectivement. Les extraits des souches Xi48 (*Pseudomonas* sp.), Xi35' (*Bacillus subtilis*) et Xi37' (*Bacillus cereus*) ont donné des effets moins importants, avec des zones de 8.33, 8.33 et 7mm respectivement. Par contre, les autres filtrats tels que Xi47, Xi29 et B5 n'ont d'effet significatif, et ont donné des zones intermédiaires variant entre 12 et 15.33 mm ce qui demande une exploitation plus profonde de ces résultats. Des résultats similaires ont été relevés avec les souches de référence.

Ces résultats sont similaires à ceux de Chan *et al.* (2009), qui ont testé des filtrats des souches de *Bacillus subtilis*, afin d'inhiber la croissance de *Fusarium graminearum*, notons qu'ils ont utilisé des suspensions sporales de concentrations de 10^4 spores/ml, par contre nous avons utilisé des concentrations de 74×10^6 et 196×10^6 sp/ml avec Foa et Fsc respectivement. D'autre part, Dunlap *et al.* (2011) ont démontré que des filtrats bactériens de *Bacillus subtilis* avec une absorbance équivalente à 7 unité de DO, avaient une capacité d'inhibition sur la croissance de *Gibberella zeae*, alors que la DO des filtrats de nos isolats a varié entre 0.55 et 2.23.

Globalement, c'est le Pi qui a été le plus résistant envers les filtrats testés. Toutefois, une sensibilité a été observée avec trois d'entre eux, celui de Xi12 (*Bacillus*) et Xi48 ont donné des zones nettes de 19.66 et 8.33 mm respectivement. Alors que, celui de Xi1 a donné une zone intermédiaire de 14.66mm. Mezaache-Aichour *et al.* (2015) ont pu démontrer que la souche Xi48 appartenant au genre *Pseudomonas* spp. est capable de produire du DAPG. Gleeson *et al.* (2010) ont rapporté que ce dernier pouvait inhiber la croissance des Oomycètes et des champignons filamenteux et qu'il avait aussi une activité fongistatique vis-à-vis de *Saccharomyces cerevisiae*. D'autres études ont auparavant démontré l'efficacité du DAPG, qui altère les membranes de *Pythium* spp. en inhibant particulièrement les zoospores de cet oomycète (De Souza *et al.*, 2003).

CONCLUSION

L'antagonisme entre les bactéries et les champignons est un mécanisme d'interaction naturel et présent dans l'environnement d'une façon stable et consistante. Les résultats obtenus dans ce travail montrent que les bactéries testées peuvent être utiles pour la lutte biologique contre les maladies fongiques des plantes, comme alternatif prometteur d'un succès dans le futur. Nos extraits ont montré une efficacité considérable contre les champignons testés. En effet, les souches appartenant au genre *Pseudomonas* et *Bacillus* sont capables de produire des composés ayant un large spectre d'activité de bio-contrôle vis-à-vis de champignons appartenant à différentes classes : ascomycète, deutéromycète et oomycète.

REMERCIEMENTS

Tous nos remerciements sont adressés au Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique pour son soutien financier dans le cadre des programmes de recherche "CNEPRU N° F01220100022 et PNR 1 / u19 / 332 F01220130088".

BIBLIOGRAPHIE

- Belatrous Z., 2011- *Contribution à l'étude des sols suppressif de la region de Ain oulmane*. Mémoire de Master, UFA Sétif1, Algérie.
- Chan Y., Savard M. E., Reid L. M., Cyr T., McCormick W. A., Seguin C., 2009- Identification of lipopeptide antibiotics of a *Bacillus subtilis* isolate and their control of *Fusarium graminearum* diseases in maize and wheat. *Bio Control*, 54, 567-574.

- Cook R. J., Anders L., de Zoeten G. A., Doane C. G., Hardy R. W. F., Hemming B., Kuc J., Mankau R., Miller D., Ryan C. A., Smith Jr. M. S., 1987- Report of the research briefing panel on biological control in managed ecosystems. *Natio Acad Press* 57-68.
- Cook R. J., 1993- Making greater use of introduced microorganisms for biological control of plant pathogens. *Annu Rev Phytopathol* 31, 53-80.
- De Souza J. T., Weller D. M., Raaijmakers J. M., 2003- Frequency, diversity and activity of 2,4-diacetylphloroglucinol-producing fluorescent *Pseudomonas* spp. in Dutch take-all decline soils. *Phytopathol* 93, 54-63.
- Dunlap C. A., Schisler D. A., Price N. P., Vaughn S. F., 2011- Cyclic Lipopeptide profile of three *Bacillus subtilis* strains antagonist of *fusarium* head blight. *J Microbiol*, 49, 603-609.
- Ebstrup T., Saalbach G., Egsgaard H. A., 2005- proteinics study of *in vitro* cyts germination and appressoria formation in *Phytophthora infestans*. *Proteomics*, 5, 2839-2848.
- Gleeson O.F., Gara O., Morrissey J. P., 2010- The *Pseudomonas fluorescens* secondary metabolite 2,4-diacetylphloroglucinol impairs mitochondrial function in *Saccharomyces cerevisiae*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 97, 261-273.
- Haas D., Défago G., 2005- Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent *Pseudomonads*. *Nat Rev Microbiol*, 3, 307-319.
- Mansouri S., Remadna H., 2013- *Identification de bactéries isolées de la rhizosphère*. Mémoire de Master, UFA Sétif1, Algérie.
- Mezaache-aichour S., Haichour N., Taleb Z., Benlarbi N., Guechi A., Zerroug M.M., 2015- Activités d'isolats indigènes antagonistes par des substances similaires au phloroglucinol. AFPP – Cinquième Conférence Internationale sur les méthodes alternatives en protection des Plantes. Lilles, 10, 11 et 12 Mars 2015. pp.301-308.
- Price-Whelan A., Dietrich L. E., Newman D. K., 2006- Rethinking secondary metabolism: physiological roles for phenazine antibiotics. *Nat Chem Biol*, 2, 71-78.
- Sayah N., 2011- *Contribution à l'étude des sols suppressifs de la région de Ain azel*. Mémoire de Master, UFA Sétif1, Algérie.
- Schouten A., Maksimova O., Cuesta-Arenas Y., van den Berg G., Raaijmakers J. M., 2008- Involvement of the ABC transporter BcAtrB and the laccase BcLCC2 in defence of *Botrytis cinerea* against the broad-spectrum antibiotic 2,4-diacetylphloroglucinol. *Environ Microbiol*, 10, 145-157.
- Tofazzal M. I., von Tiedemann A., 2011- 2,4-Diacetylphloroglucinol suppresses zoosporogenesis and impairs motility of Peronosporomycete zoospores. *World J Microbiol Biotechnol*, 27, 9, 2071-2079.