

**AFPP – CINQUIÈME CONFÉRENCE INTERNATIONALE
SUR LES MÉTHODES ALTERNATIVES DE PROTECTION DES PLANTES
LILLE – 11 AU 13 MARS 2015**

**METABOLITES IMPLIQUES DANS LA PROMOTION DE LA CROISSANCE DES PLANTES ET LEUR
PROTECTION**

N. HAICHOURL^{(1)*}, S. MEZAACHE-AICHOURL⁽¹⁾, A. BOUKHALFA⁽¹⁾, I. MADACI⁽¹⁾, A. GUECHI⁽¹⁾ et
M.M. ZERROUG

⁽¹⁾ LMA DEPARTEMENT DE MICROBIOLOGIE, FACULTÉ SNV, UNIVERSITÉ FERHAT ABBAS SÉTIF1 (EL
BEZ), SÉTIF 19000, ALGÉRIE. MÉL *: haichournora@yahoo.fr

RÉSUMÉ

La baisse des rendements agricoles est due à plusieurs facteurs biotiques et abiotiques et aux agents phytopathogènes. La lutte chimique, largement utilisée, n'est plus acceptable en raison de ses effets néfastes sur l'environnement, et la santé de l'homme et des animaux. La lutte biologique peut être utilisée comme alternative efficace et sans nuisances, par utilisation de bactéries productrices de métabolites secondaires comme l'acide indole acétique (AIA), la production de phosphatases, des sidérophores et l'acide cyanhydrique (HCN). Les bactéries testées, isolées de rhizosphères de blé et de pomme de terre dans la région de Sétif (Algérie), sont déjà caractérisées pour leurs capacités antagonistes vis-à-vis d'agents phytopathogènes telluriques. Elles produisent toutes l'AIA et des phosphatases, 38% de ces souches produisent des sidérophores, une seule bactérie produit le HCN.

Mots-clés : antagonisme, agents de biocontrôle, métabolites secondaires, rhizobactéries.

ABSTRACT

METABOLITES INVOLVED IN PROMOTING PLANTS GROWTH AND THEIR PROTECTION

Low crop yields are due to several biotic and abiotic factors and plant pathogens. Chemical control, widely used, is no longer acceptable because of its harmful effects on the environment and the health of humans and animals. Biological control can be an effective alternative without nuisance using bacteria that produce secondary metabolites including indole acetic acid (IAA), phosphatases, siderophores and hydrocyanic acid (HCN). Tested bacteria, isolated from wheat and potato rhizospheres in the region of Sétif (Algeria), are already characterized for their antagonistic capacity against plant pathogens. All these strains produce IAA and phosphatases, 38% of them produce siderophores, only one bacterium produces HCN.

Keywords: antagonism, biocontrol agents, rhizobacteria, secondary metabolites.

INTRODUCTION

Les microorganismes pathogènes causent d'importants dommages lors de la production de végétaux tant en milieu agricole que forestier comme les champignons tels que *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani*, *Gaeumannomyces graminis* ainsi que l'oomycète *Phytophthora capsici* (Allaire, 2005). L'antagonisme microbien est un mécanisme par lequel les rhizobactéries protègent les plantes contre les microorganismes pathogènes (Adhikari et al, 2013). Les rhizobactéries antagonistes colonisent la rhizosphère et jouent un rôle dans le contrôle biologique en inhibant la croissance d'un grand nombre d'agents phytopathogènes par la production d'une large gamme de métabolites secondaires. Les métabolites secondaires bactériens les plus caractérisés sont les sidérophores, l'acide indole acétique, le HCN, les enzymes solubilisant les phosphates (phosphatases), les phénazines, phloroglucinols, pyolutéorine, pyrrolnitrine et des lipopeptides (Haas et Defago, 2005). Plusieurs espèces du genre *Pseudomonas* forment un large groupe colonisant le sol et les plantes la plupart étant saprophytes, inhibent la croissance d'un grand nombre d'agents phytopathogènes et réduisent l'incidence des maladies racinaires (Allaire, 2005). De nombreux métabolites secondaires sont de puissants antibiotiques et sont largement utilisés en médecine humaine, ils suppriment les phytopathogènes et jouent un rôle dans le biocontrôle des maladies des plantes (Nadeem et al, 2012).

L'objectif de cette étude est la mise en évidence de la production de métabolites secondaires comme l'AIA, les phosphatases, les sidérophores et le cyanure d'hydrogène par des bactéries isolées de rhizosphères de blé et de pomme de terre de la région de Sétif (Algérie).

MATERIEL ET MÉTHODE

MATÉRIEL BIOLOGIQUE

Souches de référence utilisées comme témoins: *Pseudomonas protegens* sp-nov CHA0 (généreusement offerte par le Pr Haas, Lausanne Suisse; Ramette et al, 2011) et *Pseudomonas chlororaphis* sub sp. *aureofaciens* ou souche 2 (Mezaache-Aichour et al, 2012a).

Souches rhizosphériques testées (21 souches): isolées de rhizosphères de blé et de pomme de terre dans la région de Sétif (Mezaache-Aichour et al, 2012b, c, 2013).

METHODES

Production d'AIA

La quantification d'AIA et ses dérivés est évaluée par méthode colorimétrique dans le milieu TSB (tryptic soy agar) additionné de L-tryptophane à 200µg/ml. Les tubes sont ensemencés en double exemplaire par les souches à tester et les souches témoins. Un tube de TSB sans tryptophane non ensemencé sert de témoin négatif, un autre avec du L-tryptophane à 200µg/ml et non ensemencé sert de témoin positif. Tous les tubes sont incubés 72h à 30°C au bain marie agitant (180tours/mn) et à l'obscurité (Naik et Sakthivel, 2006). Après centrifugation à 5000 t/mn pendant 12mn, 1ml de surnageant est ajouté à 2ml de réactif de Salkowski et agité à l'aide d'un agitateur (Vortex). Après 20mn d'incubation à l'obscurité, l'absorbance est mesurée par un spectrophotomètre (Thermo Scientific) à 535nm. La présence d'AIA se traduit par une coloration rose dont l'intensité est proportionnelle à la concentration d'AIA (Tarnawski et al, 2006). L'évaluation quantitative d'AIA est calculée selon la méthode de Bano et Musarrat (2003).

Mise en évidence des phosphatases

La solubilisation des phosphates est qualitativement évaluée en milieu Pikovskaya selon la méthode décrite par Mehta et Nautial (2001) In Mezaache-Aichour (2012). Le milieu ensemencé par la souche à tester en double exemplaire est incubé 96h à 30°C au bain marie sous agitation à 180 tours/mn, une centrifugation à 5000t/mn pendant 12mn est suivie par la mesure de l'absorbance du surnageant récupéré à 600 nm (Humaira et Bano, 2011). La décoloration du milieu survient suite à l'abaissement du pH du milieu en présence de bleu de bromophénol (indicateur de pH).

Mise en évidence de la production de Sidérophores

La production de sidérophores par les bactéries est testée sur milieu au succinate (MS) pauvre en Fer (Jankiewicz, 2006) à raison de 30ml/flacon. Les milieux sont ensemencés en duplicata par les souches à tester et les souches de référence témoins. Un flacon de MS non inoculé sert de témoin. Après incubation au bain marie 96h à 30°C sous agitation permanente (180 tours/mn), le changement de couleur du milieu et la fluorescence indiquent la production de sidérophores par les bactéries.

Production de HCN

Après ensemencement, en duplicata, du milieu TSB (50ml/flacon) par la souche à étudier, des bandelettes de papier Whatman n°1 stérilisées et saturées avec une solution de picrate alcaline sont suspendues verticalement dans les flacons. Après incubation à 30°C sous agitation permanente à 180 tours/mn pendant 96h, la production de HCN se traduit par le changement de couleur des bandelettes saturées en picrate de sodium du jaune vers l'orange (Mezaache-Aichour, 2012).

RESULTATS

PRODUCTION D'AIA

Toutes les cultures bactériennes présentent une coloration rose ; par conséquent, toutes les souches rhizosphériques testées produisent l'AIA à partir de tryptophane. L'évaluation quantitative selon la méthode décrite par Bano et Musarrat (2003) a révélé une production assez importante d'AIA (tableau I), les concentrations étant déterminées par extrapolation à partir d'une courbe témoin. Une quantité maximale, de 20µg /ml, est produite par la souche2. D'autres souches, représentant 67% de toutes les souches étudiées, ont produit des quantités d'AIA allant de 11.50 à 16.60µg /ml, la concentration minimale, 8,5 µg /ml, est notée chez la souche XI5'.

Tableau I: DO d'AIA et teneurs en µg/ml (OD of AIA and contents in µg/ml)

Souches	DO (moyenne)	µg/ml (AIA)	Souches	DO (moyenne)	µg/ml (AIA)
CHA0	0.212	11.00	XI49	0.244	12.00
Souche2	0.398	20.00	XI28'inhib	0.238	12.00
XI45	0.325	16.60	XI37'	0.234	11.50
XI47	0.306	15.50	XI44	0.225	11.50
B21	0.297	15.00	XI38	0.218	12.00
XI23'	0.283	14.00	XI35'	0.221	11.00
B12	0.283	14.00	XI12	0.210	10.50
XI1	0.271	13.50	B10	0.198	10.00
XI29'inhib	0.269	13.50	XI30	0.189	09.50
XI56	0.263	13.00	XI14	0.181	09.00
XI29	0.252	12.50	XI5'	0.171	08.50
XI48	0.238	12.00			

CHA0, Souche2, XI45, B21.....: souches bactériennes testées (tested strains)

MISE EN ÉVIDENCE DES PHOSPHATASES

Toutes les souches testées produisent une phosphatase dont l'activité provoque une décoloration plus ou moins importante du milieu due à l'abaissement du pH (tableau II).

Tableau II: Production de phosphatases (phosphatases production)

Souches	DO (moyenne)	Souches	DO (moyenne)
CHA0	0.122	XI1	0.125
Souche2	0.134	XI35'	0.125
B12	0.205	XI14	0.122
XI12	0.160	XI5'	0.122
XI45	0.154	XI29'inhib	0.121
XI56	0.149	B21	0.118
XI23'	0.140	XI49	0.118
XI29	0.140	XI44	0.116
XI30	0.132	XI37'	0.107
XI47	0.130	XI28'inhib	0.104
XI48	0.128	B10	0.102
XI38	0.127		

CHA0, Souche2, XI45, B21.....: souches bactériennes testées (tested strains)

PRODUCTION DE SIDÉROPHORES

La production de sidérophores est qualitativement évaluée sur MS. Les résultats (tableau III) montrent que 38% des souches testées produisent des sidérophores ayant pour conséquence l'apparition d'une couleur jaune verdâtre.

Tableau III: Production de sidérophores (siderophores production)

Souches	résultats*	Souches	résultats*
CHA0	+	XI1	-
Souche2	+	B12	-
B10	+	B21	-
XI14	+	XI56	-
XI12	+	XI45	-
XI5'	+	XI49	-
XI28'inhib	+	XI48	-
XI29	+	XI30	-
XI29'inhib	+	XI23'	-
XI35'	+	XI37'	-
XI38	-	XI47	-
XI44	-		

*Apparition (+) ou absence (-) de coloration jaune verdâtre ; CHA0, Souche2, XI14, B10.....: souches bactériennes testées (tested strains)

PRODUCTION DE HCN

Parmi toutes les bactéries testées (Gram positives ou Gram négatives), une seule souche, XI48, s'avère productrice de HCN au bout d'une semaine d'incubation. La souche de référence *Pseudomonas protegens* sp-nov CHA0 produit du HCN après 96h d'incubation.

DISCUSSION

PRODUCTION D'AIA

Toutes les bactéries étudiées, productrices d'AIA, présentent un intérêt potentiel pour l'amélioration des rendements agricoles par stimulation de la croissance de la plante. En effet Naik et Sakthivel (2006), Tarnawski et al. (2006), Karnwal (2009) indiquent que la stimulation maximum de la

croissance des plantes est constatée dans des rhizosphères, de blé et de pomme de terre, colonisées par des souches de *Pseudomonas* sp. productrices d'AIA.

Dans le milieu contenant du L-tryptophane à 200 µg/ml, la souche 2 a produit la plus forte concentration d'AIA : 20 µg/ml. et 67% des souches ont produit entre 11.50 à 16.60 µg/ml, ces quantités sont supérieures à celles notées chez la souche de référence *Pseudomonas protegens* sp-nov CHAO. La concentration minimale est enregistrée pour la souche XI5' à 8,5 µg/ml. Cette valeur n'est cependant pas négligeable. Selon Karnwal (2009) deux souches de *Pseudomonas*, *P. fluorescens* AK1 et *P. aeruginosa* AK2, peuvent jouer un rôle critique dans la promotion de la croissance des plantes car dans un milieu contenant du L-tryptophane à 200 µg/ml, elles produisent l'AIA à des concentrations de 4.3 µg/ml et 4.1 µg/ml respectivement.

Parmi toutes ces bactéries, les bâtonnets à Gram négatif représentent 57%. En revanche, les plus grandes quantités d'AIA sont produites par les bâtonnets Gram positifs représentant 43% des souches étudiées. En effet, la production d'IAA est mise en évidence aussi chez toutes les souches étudiées par Szilagyi-Zecchin et al. (2014) mais les plus grandes quantités ont été produites par deux souches Gram positives, *Bacillus* CNPSo 2477 et CNPSo 2478, avec 105,2 et 105,11 µg/mL respectivement.

MISE EN EVIDENCE DES PHOSPHATASES

Toutes les bactéries testées (isolées de la région de Sétif) solubilisent les phosphates. La capacité de solubilisation des phosphates, peut avantager la souche dans sa compétition et son adaptation à divers écosystèmes (Mezaache-Aichour, 2012). Nos résultats sont en accord avec ceux de Banerjee et al. (2010) et de Humaira et Bano (2011) qui ont rapporté que les rhizobactéries solubilisent efficacement divers phosphates insolubles en libérant des acides organiques. En outre, Rajkumar et al. (2006) indiquent que la production de sidérophores et la solubilisation de phosphates par *Pseudomonas* sp. PSA4 et *Bacillus* sp. BA32 stimulent la prolifération des racines des plantes et améliorent l'absorption des minéraux du sol tels que le fer et le phosphate par la plante hôte.

MISE EN EVIDENCE DE LA PRODUCTION DE SIDEROPHORES

Nos résultats montrent que 38 % des rhizobactéries étudiées produisent des sidérophores, elles jouent probablement un rôle majeur dans la promotion de la croissance des plantes. Parmi ces bactéries, isolées de la région de Sétif et productrices de sidérophores, les bâtonnets à Gram négatifs représentent 70% et sont fluorescentes, produisent l'AIA, des phosphatases et utilisent les nitrates. Toutes ces bactéries sont par conséquent bénéfiques aux plantes. Djibaoui et Bensoltane (2005) rapportent que *Pseudomonas fluorescens* sécrète des pyoverdines pour couvrir ses besoins essentiels en fer. En plus, Radzki et al. (2013) ont constaté une meilleure croissance de plants de tomate traités par une culture bactérienne ou le surnageant de la souche C138 productrice de quantités élevées de sidérophores. Les sidérophores microbiens peuvent stimuler directement la croissance des plantes en augmentant la disponibilité du fer dans le sol entourant les racines ou indirectement par inhibition compétitive de la croissance des pathogènes des plantes en piégeant le fer et le rendant moins disponible pour les agents pathogènes (Fgaier et Eberl, 2011).

PRODUCTION DE HCN

La souche XI48 produisant le HCN pourrait jouer un rôle important dans la protection des plantes contre les champignons telluriques phytopathogènes puisque la souche de référence *Pseudomonas protegens* sp-nov CHAO est productrice de HCN. Elle est, utilisée comme agent de biocontrôle, colonisant les racines et protégeant de nombreuses plantes des maladies causées par les champignons telluriques (Ramette et al, 2003 ; Jousset et al, 2006). La souche XI48, productrice de HCN, produit aussi une molécule ayant des caractéristiques du phloroglucinol (Benlarbi et Taleb, 2013). Cette bactérie pourrait jouer un rôle dans la protection des cultures de blé car il a été démontré que le HCN et le 2,4-diacétylphloroglucinol, produits par les bactéries, jouent un rôle important dans la suppression de la pourriture noire du tabac causée par *Thielaviopsis basicola* (Nadeem et al, 2012).

Les bactéries testées sont considérées comme favorisant la croissance des plantes. Elles produisent des métabolites secondaires comme l'AIA, la phosphatase, les sidérophores et l'HCN. Selon Rajkumar et al. (2006), le maximum de stimulation de croissance par *Pseudomonas* sp. PSA4 peut être attribué à la production de sidérophores, d'AIA et la solubilisation de phosphate ce qui est en parfaite concordance avec nos résultats et nous nous permettons de considérer les rhizobactéries testées comme bénéfiques pour les plantes.

CONCLUSION

Les bactéries isolées de sols de blé et de pomme de terre de la région de Sétif produisent en majorité des métabolites secondaires parfois même à des teneurs plus élevées que celles enregistrées pour la souche de référence *Pseudomonas protegens* sp-nov CHA0. Ces bactéries peuvent être utilisées comme agents, potentiels et prometteurs, de biocontrôle. Toutefois, cette éventualité ne pourra être envisagée que si l'efficacité observée *in vitro* se confirme par des essais *in vivo* portant sur la mise en évidence de la stimulation de la croissance des plantes et leur protection contre certaines maladies.

REMERCIEMENTS

Nous tenons à remercier vivement 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 et PNR 1 / u19 / 332 F01220130088".

BIBLIOGRAPHIE

- Adhikari A., Dutta S., Nandi S., Bhattacharya I., De Roy M., Sarkar G., Mandal T., 2013 - Antagonistic potentiality of native rhizobacterial isolates against root rot disease of okra, incited by *Rhizoctonia solani*. *Afric J Agri Res*, 8, 4, 405-412.
- Allaire M., 2005 - *Diversité fonctionnelle des Pseudomonas producteurs d'antibiotiques dans les rhizosphères de conifères en pépinières et en milieu naturel*. Mémoire de Maîtrise ès Sciences en Microbiologie Agricole, Faculté des sciences de l'agriculture et de l'alimentation université Laval Québec, Canada.
- Banerjee S., Palit R., Sengupta C., Standing D., 2010 - Stress induced phosphate solubilization by *Arthrobacter* sp. and *Bacillus* sp. isolated from tomato rhizosphere. *AJCS*, 4, 6, 378-383.
- Bano N., Musarrat J., 2003 - Characterization of a new *Pseudomonas aeruginosa* strain NJ-15 as a potential biocontrol agent. *Cur Microbiol*, 46, 324-328.
- Benlarbi N., Taleb Z., 2013 - *Extraction de DAPG et tests biologiques*. Mémoire de Master, UFA Sétif1, Algérie.
- Djibaoui R., Bensoltane A., 2005 - Effect of iron and growth inhibitors on siderophores production by *Pseudomonas fluorescens*. *African J Biotech*, 4, 7, 697-702.
- Fgaier H., Eberl H., 2011 - Antagonistic control of microbial pathogens under iron limitations by siderophore producing bacteria in a chemostat setup. *J Theo Biol*, 273, 103-114.
- Haas D., Defago G., 2005 - Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent *Pseudomonas*. *Nat Rev Microbiol*, 3, 307-319.
- Humaira Y., Bano A., 2011 - Isolation and characterization of phosphate solubilizing bacteria from rhizosphere soil of weeds of khewra salt range and attock. *Pak J Bot*, 43, 3, 1663-1668.
- Jankiewicz U., 2006 - Synthesis of siderophores by soil bacteria of the genus *Pseudomonas* under various culture conditions. *Acta Sci Pol Agri*, 5, 2, 33-44.
- Jousset A., Lara E., Wall L.-G., Valverde C., 2006 - Secondary metabolites help biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* CHA0 to escape protozoan grazing. *Appl Environ Microbiol*, 72, 11, 7083-7090.
- Karnwal A., 2009 - Production of indole acetic acid by fluorescent *Pseudomonas* in the presence of L-tryptophan and rice root exudates. *J Plant Pathol*, 91, 1, 61-63.

Mezaache-Aichour S., 2012 - *Localisation des déterminants de la suppression de quelques souches de Pseudomonas isolées de la rhizosphère de la pomme de terre*. Thèse de Doctorat es Sciences, Microbiologie, UFA Sétif, Algérie.

Mezaache-Aichour S., Guechi A., Nicklin J., Drider D., Prevost H., Strange R.N., 2012a- Isolation, identification and antimicrobial activity of *Pseudomonas* isolated from the rhizosphere of potatoes growing in Algeria. *Plant Pathol*, 94, 89-98.

Mezaache-aichour S., Sayah N., Zerroug M.-M., Haichour N., Guechi A., 2012 b- Criblage de bactéries telluriques à caractère suppressif. AFPP – 10^e Conférence internationale sur les maladies des plantes Tours – 3, 4 et 5 Décembre 2012, 614-619.

Mezaache-aichour S., Sayah N., Zerroug M.-M., Haichour N., Guechi A., 2012 c- Habilité de biocontrôle d'isolats bactériens de la rhizosphère du blé vis-à-vis des phytopathogènes d'origine tellurique. AFPP– 10^e Conférence internationale sur les maladies des plantes Tours – 3, 4 et 5 Décembre 2012, 703-708.

Mezaache-Aichour S., Haichour N., Sayeh N., Guechi A., Zerroug M.-M., 2013 - Isolation and selection of indigenous bacterial strains with suppression properties from the rhizospheres of potato and wheat. *Ann Rev Res Biol*, 3, 4, 405-415.

Nadeem S.-M., Shaharoonab B., Arshad b.-M., Crowley D.-E., 2012 - Population density and functional diversity of plant growth promoting rhizobacteria associated with avocado trees in saline soils. *Appl Soil Ecol*, 62, 147–154.

Naik R.-P., Sakthivel N., 2006 - Functional characterization of a novel hydrocarbonoclastic *Pseudomonas* sp. strain PUP6 with plant-growth-promoting traits and antifungal potential. *Res Microbiol*, 157, 538–546.

Radzki W., Gutierrez Mañero F. J., Algar E., Lucas García J. A., García-Villaraco A., Ramos Solano B., 2013 - Bacterial siderophores efficiently provide iron to iron-starved tomato plants in hydroponics culture. *Antonie van Leeuwenhoek*, 104, 321–330.

Rajkumar M., Nagendran R., Lee K.J., W.H Lee, Kim S.-Z., 2006 - Influence of plant growth promoting bacteria and Cr⁶⁺ on the growth of Indian mustard. *Chemosphere*, 62, 741–748.

Ramette A., Frapolli M., Défago G., Moënné-Loccoz Y., 2003 - Phylogeny of HCN synthase-encoding *hcnBC* genes in biocontrol fluorescent *Pseudomonads* and its relationship with host plant species and HCN synthesis ability. *MPMI*, 16, 6, 525–535.

Ramette A. , Frapolli M., Fischer-Le Saux M., Gruffaz C. M., Défago G., Sutra L., Moënné-Loccoz Y., 2011- *Pseudomonas protegens* sp.nov. widespread plant-protecting bacteria producing the biocontrol compounds 2,4-diacetylphloroglucinol and pyoluteorin . *Appl Microbiol*, 34, 180-188.

Szilagyi-Zecchin V.- J., Ikeda A C., Hungria M., Adamoski D., Kava-Cordeiro V., Glienke C., Galli-Terasawa L.- V., 2014 - Identification and characterization of endophytic bacteria from corn (*Zea mays* L.) roots with biotechnological potential in agriculture. *AMB Express*, 4, 26, 1-9.

Tarnawski S., Hamelin J., Jossi M., Aragno M., Fromin N., 2006 - Phenotypic structure of *Pseudomonas* populations is altered under elevated p CO₂ in the rhizosphere of perennial grasses. *Soil Biol Biochem*, 38, 1193–1201.