

ANTAGONISME DES BACTERIES A GRAM POSITIF ET GRAM NEGATIF VIS-A-VIS DE
CHAMPIGNONS DU GENRE *FUSARIUM* RESISTANTS AUX FONGICIDES

S. MEZAACHE-AICHOURE⁽¹⁾, N. HAICHOURE⁽²⁾ et M. M. ZERROUG⁽³⁾

⁽¹⁾ LMA, Faculté SNV Université ferhat ABBAS Sétif 1, Algérie, mezaic2002@gmail.com,
mezaache@univ-setif.dz

⁽²⁾ LMA, Faculté SNV Université ferhat ABBAS Sétif 1, Algérie ;haichournora@gmail.com

⁽³⁾ LMA, Faculté SNV Université ferhat ABBAS Sétif 1, Algérie ;med.zerroug@gmail.com

RÉSUMÉ

La lutte biologique contre les maladies des plantes est proposée comme un moyen alternatif aux substances antifongiques. Dans le présent travail on a évalué l'activité antagoniste de 12 isolats à Gram positif et quatre isolats à Gram négatif vis-à-vis de quatre souches fongiques appartenant au genre *Fusarium*, préalablement caractérisés selon leurs niveaux de résistance à certains fongicides utilisés localement. Les taux d'inhibitions des croissances fongiques obtenues avec les Gram positifs étaient variables avec des valeurs allant de 7 à 81 %, selon l'isolat bactérien et la souche fongique. Par contre pour les Gram négatifs, la souche XI48 a démontré son efficacité contre ces champignons avec un pourcentage d'inhibition considérable allant de 40 à 70%.

Mots-clés : biocontrôle, *Fusarium*, résistance aux fongicides, Gram.

ABSTRACT

ANTAGONISM OF GRAM POSITIVE AND GRAM NEGATIVE BACTERIA AGAINST FUNGI OF THE GENUS *FUSARIUM* RESISTANT TO FUNGICIDES

Biological control of plant diseases is proposed as an alternative to antifungal substances. In the present work, the antagonistic activity of 12 Gram-positive and four Gram-negative isolates was evaluated against four fungal strains belonging to the genus *Fusarium*, previously characterized for resistance to locally used fungicides. Fungal growth inhibitory rates obtained with Gram positive were variable with values ranging from 2.5 to 81%, depending on the bacterial isolate and the fungal strain. On the other hand, for Gram negative, strain XI48 has demonstrated its effectiveness against these fungi with a considerable inhibition rate ranging from 40 to 70 %.

Keywords: biocontrol, *Fusarium*, resistance to fungicides, Gram.

INTRODUCTION

Les microorganismes sont très nombreux, ubiquistes, très diversifiés, très adaptatifs... Ils ont une importance primordiale dans de nombreux domaines y compris le domaine agricole. Les interactions plantes/microorganismes sont parfois bénéfiques mais peuvent aussi être néfastes quand il s'agit de champignons phytopathogènes. C'est le cas des *Fusarium* qui sont responsables de nombreuses maladies de plantes à l'origine des pertes de millions de tonnes de céréales de par le monde tels que le blé, l'orge, le maïs ... etc (Kazan *et al.*, 2012 ; Zhang *et al.*, 2013). De telles pertes concernent aussi les grains contaminés par les mycotoxines (Kazan *et al.*, 2012).

Pour lutter contre ce problème et protéger les récoltes, la lutte chimique est appliquée en utilisant des substances éliminant ces champignons phytopathogènes. Cependant, cette lutte chimique a eu des effets néfastes sur la santé de l'homme et sur l'environnement, de plus certains de ces champignons phytopathogènes, tels que les *Fusarium*, ont développé une résistance envers ces fongicides (Leroux, 2003 ; Mezaache-Aichour *et al.*, 2018). La lutte contre ces champignons résistants aux fongicides devient un souci majeur pour l'homme.

Si les bactéries sont plus connues comme pathogènes du règne animal, elles le sont moins pour les effets bénéfiques qu'elles peuvent avoir, soit dans la stimulation de la croissance des plantes, soit dans la protection de celles-ci contre les champignons phytopathogènes (Haas et Défago, 2005). Certaines interactions existant entre ces microorganismes peuvent constituer une voie de substitution aux intrants chimiques. A cet effet, des bactéries antagonistes productrices de substances antibiotiques et/ou antifongiques peuvent être utilisées contre ces phytopathogènes, et répondent ainsi aux exigences économiques et écologiques. Cette forme de bio-protection permet de réduire et/ou d'inhiber l'apparition, la croissance et le développement des champignons phytopathogènes résistants aux fongicides.

L'objectif de notre travail est d'évaluer le pouvoir antagoniste de quelques souches de bactéries à Gram négatif et positifs déjà caractérisées pour leurs capacités antagonistes (Mezaache-Aichour *et al.*, 2013) vis-à-vis de champignons phytopathogènes telluriques du genre *Fusarium* résistants aux fongicides utilisés localement.

MATERIEL ET MÉTHODES

MATERIEL BIOLOGIQUE

Douze souches bactériennes à Gram positif et quatre à Gram négatif préalablement isolées des rhizosphères du blé et de la pomme de terre (Belatrous, 2011 ; Sayah, 2011) ; ont été testées quant à leurs capacités antagonistes contre quatre champignons du genre *Fusarium* d'espèces non déterminées (tableau I). Ils montrent parfois de faibles efficacités ou des résistances variées à certains des fongicides testés (benzimidazoles, dithiocarbamates, acétamides) (Mezaache-Aichour *et al.*, 2018) isolés par Belatrous (2011) et Sayah (2011) et identifiés par Taoui (2011).

Tableau I : Souches fongiques testées (Fungal strains tested).

Champignon	Numéro attribué
<i>Fusarium</i> sp.	2
<i>Fusarium</i> sp.	5
<i>Fusarium</i> sp.	14
<i>Fusarium</i> sp.	29

METHODES

Culture des microorganismes

Des suspensions bactériennes en bouillon nutritif à usage général NB (Nutrient Broth) sont préparées à partir de cultures des souches à tester. Ces suspensions sont incubées 18h à 30°C. Les champignons à tester sont repiqués sur gélose PDA (Potato Dextrose Agar) et incubés à 28°C pendant 5 à 7 jours.

Activité antagoniste bactérie/champignon

Ce test est une confrontation directe champignons / bactéries en boîtes de Petri sur milieu gélosé PDA. A partir des boîtes des cultures de champignons, des disques de Ø 3mm sont découpés à l'aide d'emporte-pièce stériles. Un disque est déposé d'un côté d'une boîte de Pétri. Dans la moitié opposée, la souche bactérienne à tester est ensemencée en stries (figure 1). Une boîte témoin

(contrôle) reçoit uniquement le disque de champignon. Ce test est effectué en triplicata pour les souches bactériennes contre les quatre champignons à étudier (*Fusarium* sp. N^{os} 2, 5, 14 et 29). Toutes les boîtes sont incubées à température ambiante disposées de manière aléatoire après randomisation et subissent des lectures à intervalles réguliers allant de 3 à 5 jours (en fonction de la vitesse de croissance du témoin) jusqu'à ce que la culture des champignons témoins envahisse toute la boîte.

Le pourcentage d'inhibition (% I) est calculé selon la formule :

$$\% I = [(Dc - Dt) / Dc] \times 100$$

Dc : diamètre du champignon contrôle (témoin)

Dt : diamètre du champignon en présence de la bactérie à tester

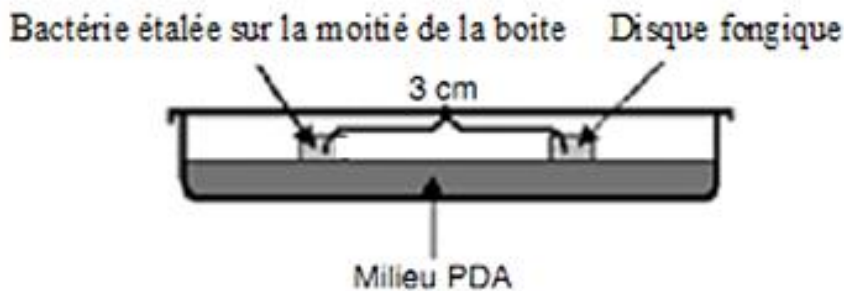


Figure 1 : Confrontation directe bactérie/champignon (Direct confrontation bacteria / fungus)

Analyse statistique

Les diamètres de la croissance fongique ont été analysés par rapport au témoin par analyse de la variance unidirectionnelle (ANOVA) et le test avec $P < 0.05$ a été considéré comme statistiquement significatif.

RESULTATS

En fonction du champignon considéré, les résultats d'inhibition obtenus ont varié entre 7 et 81% pour les bactéries à Gram positif et de 3 à 68% pour les bactéries à Gram négatif. L'apparition de cette activité antagoniste a été aussi très variable, où l'on a observé l'apparition d'une inhibition précoce et importante avec certaines souches (souche XI48) ; alors que pour d'autres elle n'est apparue que beaucoup plus tardivement (souche XI1). D'autre part, certaines inhibitions ont même été ralenties ou ont régressées comme c'est le cas avec les souches XI30C inh et A1 en présence du *Fusarium* sp.14.

INHIBITION DE *FUSARIUM* SP.14

L'analyse de la variance unidirectionnelle (ANOVA) avec $P < 0.05$, a permis de déduire que les différences de l'inhibition de ce champignon sont statistiquement significatives.

Bactéries à Gram positif

L'activité de la plupart des bactéries était plus importante au début de la confrontation, augmentant progressivement mais faiblement jusqu'à la 3^{ème} lecture, ensuite on a observé un ralentissement de cette inhibition (fig.2 A).

Bactéries à Gram négatif

Dans ce cas, la plupart des souches étaient très actives au début de l'étude (3/4, fig.2 A), mais cette activité a ensuite été très ralentie comparativement aux bactéries à Gram positif.

INHIBITION DE *FUSARIUM* SP. 29

Là aussi l'analyse statistique (ANOVA) avec $P < 0.05$, a montré que ce sont des résultats avec des différences statistiquement significatives. Cependant, par comparaison au champignon précédent le ralentissement a été remarqué dès la seconde lecture.

Bactéries à Gram positif

Pour la plupart des isolats testés, on a observé une régression de l'inhibition lors de la seconde lecture par-rapport à la première, ensuite on a vu que cette inhibition reprenait progressivement (fig. 2 B).

Bactéries à Gram négatif

Là aussi on a observé une regression lors de la seconde lecture. Alors que 50% des isolats ont montré une regression lors de la dernière lecture après une légère progression, les 50% restants ont repris leurs progression (fig.2 B).

INHIBITION DES *FUSARIUM* SP. 2 ET SP.5

Dans le cas de ces deux isolats fongiques, et malgré les inhibitions observées, l'étude statistique des résultats n'a montré aucune différence significative entre les différents isolats, qu'ils soient à Gram positif ou à Gram négatifs .

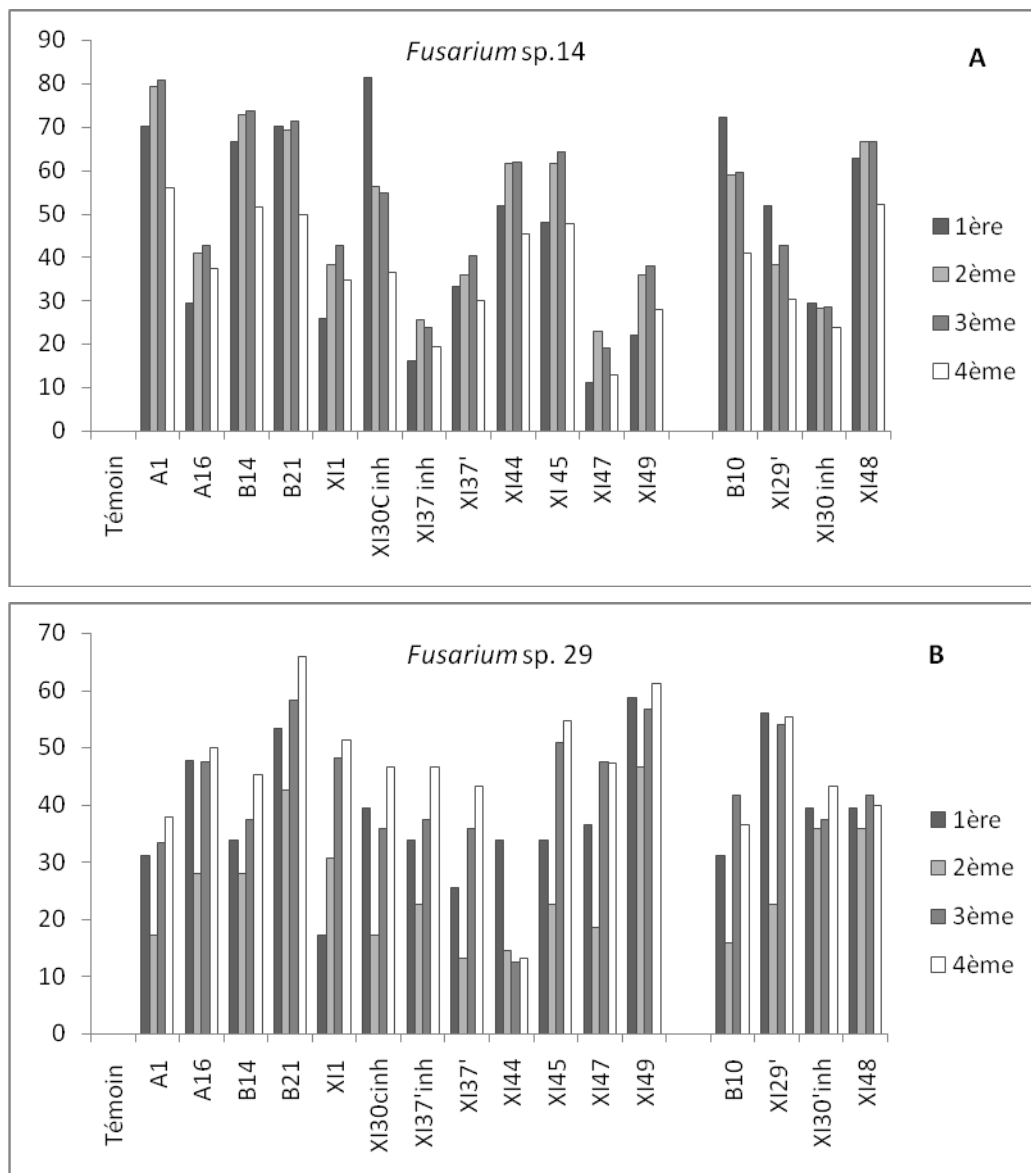


Figure 2 : Pourcentages des inhibitions observées en fonction des souches fongiques testées (Percentage of the observed inhibitions according to tested fungal strains).

A : Inhibition de *Fusarium* sp.14 et B : Inhibition de *Fusarium* sp. 29 (A : inhibition of *Fusarium* sp. 14 and B : Inhibition of *Fusarium* sp.29)

1^{ère}, ...,4^{ème} : lectures (1st,...4th : notation) ; A1.....X149 : bactéries à Gram positif (gram positive bacteria) ; B10.....X148 : bactéries à Gram négatif (Gram negative bacteria).

DISCUSSION

La lutte biologique par des antagonistes microbiens du sol est une alternative très prometteuse par rapport aux fongicides car ces antagonistes sont naturellement inhibiteurs des agents pathogènes, et représentent une action alternative à la résistance aux fongicides. Ils sont très répandus naturellement dans les écosystèmes. Ils peuvent en effet réduire ou inhiber la croissance du pathogène. Différentes études ont impliqué des métabolites secondaires antifongiques produits par les bactéries dans le contrôle des maladies des plantes causées par des champignons pathogènes. Les souches testées ici pour leurs activités antagonistes contre des champignons phytopathogènes (Taoui, 2011) résistants à certains fongicides (Mezaache-Aichour *et al.*, 2018), ont déjà été caractérisées pour leurs capacités à produire des métabolites antifongiques tels que le DAPG, HCN, sidérophores ; mais aussi des phytohormones tels que l'AIA ...etc. (Benlarbi et Taleb, 2013; Boukhalfa et Madaci, 2013).

Dans des résultats antérieurs non montrés ici, Saidi *et al.* (2009), en évaluant l'activité antifongique en culture duelle de 20 isolats de *Bacillus* vis-à-vis de *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopercisi*, ont obtenu des taux d'inhibition variant entre 30 et 50 %. Parmi les vingt isolats testés, douze sont capables d'inhiber le pathogène fusarien avec un taux $\geq$ à 30 %, et trois isolats seulement donnent des taux d'inhibition $\geq$ à 50 %. Parmi les souches gram positifs actives, onze produisent des substances ayant des capacités de réduction de la croissance fongique.

Parmi les douze isolats gram+ testés ici, les souches XI45, B21, A1 et XI30Cinh inhibent les champignons avec un taux $\geq$ à 60 %. L'augmentation des taux d'inhibition avec le temps pour certains isolats démontre que l'activité antifongique est proportionnelle à la durée d'incubation de la culture duelle, cela peut être dû à l'exposition prolongée aux métabolites secondaires produits et libérés dans le milieu par les souches testées et qui sont responsables du pouvoir antagoniste de ces dernières. Elles peuvent aussi être à l'origine de la réduction de la fumonisine et/ou à la sécrétion d'endotoxines capables d'inhiber le développement du champignon phytopathogène (Song *et al.*, 2014). Ces métabolites peuvent aussi être des substances antifongiques et/ou enzymes lytiques. Les enzymes impliquées dans ce type d'interaction sont capables de dégrader la paroi des cellules fongiques comme les : Protéases, Phosphatases, Catalases, Cellulases et Chitinases (Saidi *et al.*, 2009). L'acide indole acétique (AIA) aussi produit par les isolats testés (Boukhalfa et Madaci, 2013), est une phytohormone participant à la production de l'acide cyanhydrique aussi responsable de cette inhibition (Cavaglieri *et al.*, 2005).

Certains isolats ont montré une activité maximale dès le début de l'expérience c'est le cas de la souche XI48, celle-ci produit du DAPG (Benlarbi et Taleb, 2013) et de l'HCN (Boukhalfa et Madaci, 2013) et est plus active que la souche de référence *Pseudomonas protogenes* sp. nov CHAO (Benlarbi et Taleb, 2013). Cependant, d'autres souches bactériennes sont totalement inactives au début comme les souches B10 et XI29' (pourcentage d'inhibition des champignons de 0 %), ceci laisse suggérer que ces bactéries ont besoin d'une stimulation de la part du champignon (un début de croissance mycélienne) pour qu'elles initient la synthèse des métabolites secondaires inhibant cette croissance, ou encore le champignon a sécrété des substances toxiques inhibant la croissance de la bactérie comme les fumonisines. Enfin, d'autres souches très actives au début le deviennent moins après 3 jours ; il s'agit peut-être de souches ayant perdu leur énergie pour fabriquer encore plus de métabolites secondaires et auront besoin de renouveler l'énergie pour en fabriquer d'autres après quelques jours. Ceci peut aussi être une conséquence d'une résistance fongique assurée par la production des métabolites secondaires volatiles tels que les mycotoxines (Demain et Fang, 2000).

Nos résultats confirment ceux de nombreux auteurs. Selon Montesinos *et al.* (2009) dans le cas d'un mode d'action par antibiose, l'organisme antagoniste produit des métabolites secondaires toxiques pour l'agent pathogène cible. Ces métabolites produits à faibles concentrations peuvent inhiber soit la germination, soit la croissance mycélienne et/ou la sporulation des agents pathogènes. D'autre part, Humaira et Bano (2011) ont affirmé que les rhizobactéries sont capables de solubiliser efficacement divers phosphates insolubles et des acides organiques chélateurs (sidérophores). Cette affirmation assure le rôle de certains antagonistes à stimuler la croissance du champignon. En effet, la plupart de nos isolats ont déjà été testés par Boukhalfa et Madaci (2013), et ils produisent des enzymes hydrolisant les phosphates.

CONCLUSION

Bien que tous les champignons testés soient des *Fusarium*, leurs sensibilité aux souches bactériennes était relativement variable, cela suppose leur appartenance à différentes espèces.

La multiplicité des espèces à combattre nécessite de la part des bactéries antagonistes des mécanismes et/ou des métabolites, variés qui ne sont peut-être pas présents dans une seule espèce de bactéries.

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 du sol suppressif de la région d'Ain Oulmane. *UFA Sétif, Mémoire de Master*, pp : 23-34.
- Benlarbi N. et Taleb Z., 2013. Extraction de 2-4-diacétylphloroglucinol (DAPG) et tests biologiques. *Mémoire de master UFA Sétif-1*, pp28-30.
- Boukhalfa A. et Madaci I. , 2013 Production de métabolites secondaires. *UFA Mémoire de Master*, pp: 22-30.
- Cavaglieri L., Orlando J., Rodrigues M.I., Chulze S. and Cheverry M., 2005. Biocontrol of *Bacillus subtilis* against *Fusarium verticillioides* in vitro and at the maize root level. *Research in Microbiology*, 156: 748-754.
- Demain A. and Fang A., 2000. The natural functions of secondary metabolites. *Advance Biochemic*, 69: 1-39.
- Haas D. and Défago G., 2005. Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonas. *Nature Rev Microbiol*, 3:307-319.
- Humaira Y., and Bano A., 2011. Isolation and characterization of phosphate solubilizing bacteria from rhizosphere soil of weeds of Khewra salt range and attock. *Nat RevMicrobiol*, 3: 307-319.
- Kazan K., Gardiner D.M., and Manners J.M., 2012. On the trail of a cereal killer: recent advances in *Fusarium graminearum* pathogenomics and host resistance. *Mol. Plant Pathol*, 13: 399–413. doi: 10.1111/j.1364-3703.2011.00762.x
- Leroux P., 2003. Modes d'action des produits phytosanitaires sur les organismes pathogènes des plantes. *Académie des sciences/Éditions scientifiques et médicales Elsevier SAS.C. R. Biologies*, 326, 9–21.
- Mezaache-Aichour S., Akkal A., Meskine R., Haichour N. and Zerroug M.M., 2018. Resistance of Telluric Fungi to Chemical Fungicides. *International Journal of Innovative Approaches in Agricultural Research*. 2 (2): 70-78.
- 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. *Annu Res Rev Biol*, 3(4):405–415.
- Montesinos E., Bonaterra A. and Moselio S., 2009. Microbial pesticides. In *Encycmicrobiol. Academic Press, Oxford, UK*. pp 110-120.
- Saidi N., Kouki S., M'hiri F., Hajlaoui M., Mahrouk M., Ouzari H., Jedidi N. and Hasseni N., 2009. Characterization and selection of *Bacillus* sp. strain effective biocontrol agents against *Fusarium oxysporum* f-sp- *radicis-lycopersici* the causal agent of *Fusarium Crown* and root rot in tomato. *Annals of Microbiology*, 59: 191-198.
- Sayah, N., 2011. Contribution à l'étude du sol suppressif de la région d'Ain Azel. *UFA Sétif mémoire de Master* pp : 28-36.
- Song M., Yun H Y. and Ho K Y., 2014. Antagonistic *Bacillus* species as a biological control of ginseng root rot caused by *Fusarium* cf. *incarnatum*. *Journal of Ginseng Research*. 38(2): 136-145.
- Taoui S., 2011. Identification de quelques champignons telluriques de la région de Aïn Oulmene. *Sétif mémoire de Master. Department of Microbiology, Université Ferhat Abbas Setif1, Algeria*, pp: 24-30.
- Zhang J. B., Wang J. H., Gong A. D., Chen F. F., Song B., and Li X., 2013. Natural occurrence of fusarium head blight, mycotoxins and mycotoxin- producing isolates of *Fusarium* in commercial fields of wheat in Hubei. *Plant Pathol*, 62: 92–102. doi: 10.1111/j.1365-3059.2012.02639.x