

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Microbiologie
Spécialité : Biotechnologie Microbienne



Réf :.....

Mémoire de Fin de Cycle
En vue de l'obtention du diplôme

MASTER

Thème

**Isolement de bactéries telluriques « PGPR »
productrices de substances antifongiques et
stimulatrices de la croissance des plantes**

Présenté par :

M^{elle} ADOUANE Hanane et M^{elle} ADJAOUTE Lamia

Soutenu le : **23 Juin 2018**

Devant le jury composé de :

Mr. AMIR N.

Mr. NABTI E.

Melle. AIT BESSAI S.

Mme. BOUDRIES S.

MCA

Professeur

Doctorante

MAA

Président

Encadreur

Co-promotrice

Examinatrice

Année universitaire : 2017 / 2018

Remerciements

Plus de trois mois passés à travailler sur ce passionnant sujet, ce passage ne s'est pas fait tout seul et quelques personnes ont contribué de près ou de loin à nos recherches. Nous souhaiterons donc débiter ce manuscrit en les remerciant.

Nous remercions en premier lieu notre promoteur, Monsieur NABTI El-Hafid, Merci pour votre patience, vos encouragements et vos conseils rédactionnels qui nous ont aidés à mener à bien ce travail. Merci aussi pour votre accueil chaleureux au sein de votre laboratoire.

Nous remercions également notre co-promotrice M^{elle} AIT BESSAI Sylia pour son suivi attentif tout au long de ce travail, pour ces encouragements et sa bonté.

Nous exprimons nos remerciements également au membre de jury; Mme SOUAGUI et Mr AMIR, qui nous ont honorés de leur présence et d'avoir consacré de leur temps afin d'évaluer ce travail.

Nous remercions aussi tous les membres de l'équipe Biomasse et Environnement (Laboratoire de Maîtrise des Energies Renouvelables) pour leur aide et leurs encouragements et les bons moments passés ensemble.

Nous remercions également toute personne ayant contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Dédicaces

À ma mère ; Tu représentes pour moi la source de tendresse et l'exemple de dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager.

Tu as fait plus qu'une mère puisse faire pour que ses enfants suivent le bon chemin dans leur vie et leurs études.

À la mémoire de mon père ; je t'aime énormément

À mon frère Abdelhak ; Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, le dévouement et le respect que j'ai toujours pour toi.

À mes frères Djamal et kamal

À mes chères sœurs Zina et Akila; merci pour votre encouragements permanents

À mes amis Karima, Souhila et Rahim pour leur support continu

À mon binôme : Ajaoute Lamia

À tous ceux qui me sont chers

Que ce travail soit l'accomplissement de vos vœux tant allégués, et le fruit de votre soutien infallible

Hanane

DEDICACES

Je dédie ce travail

A mes chers parents : Omar et Fatiha

Sources de mes joies, secrets de ma force Vous serez toujours le modèle Papa,
dans ta détermination, ta force et ton honnêtetéMaman dans ta bonté, ta
patience et ton dévouement pour nous .Merci pour tous vos sacrifices pour que
vos enfants grandissent et prospèrent.Merci d'être tout simplement mes parents
c'est à vous que je dois cette réussite.

A la mémoire de mon très cher oncle Amirouche que Dieu accorde le repos de
son âme

A mes sœurs Leila , Lynda et Samia

A mon frère : Khaled

A mon grand-père Makhelouf

A mes grandes-mères : Dhaouia et Dahbia

A mes tantes : Nadia, Maknoute,Fadila ,salima et djamila ainsi qu'à leurs
enfants

A mes oncles : Brahim e, Karim, Madani et Kaci ainsi que leurs femmes et leurs
enfants

A mes cousins et cousines

A mon binôme : Adouane hanane et ma chère copine Louiza

A tous ceux qui me sont chères. À tous ceux qui m'aiment

LAMIA

Liste des tableaux

Tableau I : Codes et lieux de récupération des échantillons utilisés pour l'isolement.....	13
Tableau II : Propriétés physico-chimiques des échantillons du sol prélevés.....	23
Tableau III : Résultats de la capacité des quinze isolats à produire l'ammoniac (NH ₃).....	27
Tableau IV: Résultats des différents tests d'activités enzymatiques testés pour les 15 isolats.....	31
Tableau V : les caractères microscopique et biochimique des souches.....	32

Liste des figures

Figure 1 : Étapes de la sélection des souches bactériennes.....	16
Figure 2 : Mise en évidence de l'effet des souches bactériennes sur la croissance des champignons.....	17
Figure 3 : Production de Cyanure d'hydrogène (HCN).....	18
Figure 4 : Recherche de la production d'ammoniac.....	19
Figure 5 : Recherche de la production de molécules antifongiques volatiles	19
Figure 6 : Quelques aspects des colonies obtenues après purification sur milieu ou PCA.....	24
Figure 7: Activités antifongiques à l'égard de <i>Botrytis cinerea</i> , <i>Aspergillus niger</i> et <i>penicillium sp</i> des 15 isolats.....	25
Figure 8 : Pourcentage d'inhibition de la croissance (PGI%) d' <i>Aspergillus niger</i> , <i>Botrytis cinerea</i> et <i>Pinicillium sp</i> par les isolats sélectionnés.....	26
Figure 9 : Aspect de résultat positif (HCN ⁺) obtenu pour la souche A1.....	26
Figure 10 : PGI% d' <i>Aspergillus niger</i> , <i>Botrytis cinerea</i> et <i>Penicillium sp</i> sous la production des substances volatile par les 15 isolats.....	28
Figure 11 : Activité inhibitrice par les substances volatiles.....	29
Figure 12 : Aspect de résultat positif et négatif de la production d'AIA.....	29
Figure 13 : Quantité d'AIA produite par les isolats.....	30
Figure14 : Aspect des résultats positif des activités enzymatique testées : A-Cellulase, B- Lipase, C- Amylase, D-Protéase, E-Estérase, F-Uréase, G-Phosphatase, H-Chitinase.....	31

Liste des abréviations

AIA: Acide Indol Acétique

CO₂: Dioxyde de Carbon

DAPG: diacétylphloroglucinol

F.A.O: Food and Agriculture Organization

HCN: Hydrogen Cyanide

ISR: Résistance Systémique Induite

LPS: Lipopolysaccharides

NH₃: Ammoniac

ONU : Organisation des Nations Unies

PBS : Phosphate-Buffered Saline

PCA: Plate Count Agar

PGI: Percentage Growth Inhibition

PGPR: Plant Growth Promoting Rhizobacteria

UV: Ultraviolet

Sommaire

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des abréviations

Introduction.....01

Synthèse bibliographique

I- Les bactéries telluriques promotrices de la croissance des plantes

(PGPB)	03
1. Le sol.....	03
1.1. La rhizosphère.....	03
1.2. Les Rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes (PGPR).....	03
2. Mécanismes impliqués dans la stimulation de la croissance des plantes par les PGPR.....	04
2.1. Les mécanismes directs	04
2.1.1. Fixation d'azote.....	04
2.1.2. Solubilisation du phosphate.....	05
2.1.3. La production de sidérophores.....	05
2.1.4. La production des phytohormones.....	05
2.2. Les mécanismes indirects	06
2.2.1. Compétition.....	07
2.2.2. Antibiose.....	07
2.2.3. Parasitisme.....	07
2.2.4. Résistance systémique induite « ISR »	08
2.2.5. Production d'enzymes hydrolytique	08
a. Activité cellulasique.....	08
b. Activité amylasique.....	08
c. Activité chitinasique.....	08
d. Activité phosphatasique.....	09
e. Activité protéasique.....	09
f. Activité uréasique.....	09

g. Activité lipasique.....	09
II- Les champignons phytopathogènes.....	10
1. Les champignons phytopathogènes.....	10
2. Les moyens de lutte.....	10
2.1. La lutte physique.....	10
2.2. La lutte culturale.....	11
2.3. La lutte chimique.....	11
2.4. La lutte biologique.....	11
2.4.1. Mécanismes d'action d'un agent de lutte biologique.....	12
2.4.2. Les critères de sélection des agents de la lutte biologique.....	12

Partie pratique

Matériel et méthodes

1. Echantillonnage	13
2. Propriétés physicochimiques des échantillons du sol	13
2.1. Le contenu humide gravimétrique	13
2.2. pH	14
2.3. Conductivité électrique	14
2.4. Matière organique totale.....	14
3. Criblage d'isolats bactériens producteurs de molécules antifongiques et à caractères PGP..	15
3.1. Isolement et sélection des souches.....	15
3.1.1. Préparation des dilutions	15
3.1.2. Ensemencement des boîtes et mise en incubation	15
3.1.3. Purification.....	15
3.2. Mise en évidence de l'activité antifongique	17
3.2.1. Production de HCN.....	18
3.2.2. Production d'ammoniac NH ₃	18
3.2.3. Production des substances volatiles.....	19

3.3. Production d'acide indole acétique (AIA).....	20
3.4. Activités enzymatiques.....	20
3.4.1. Détermination de l'activité uréasique	20
3.4.2. Détermination de l'activité chitinasique	21
3.4.3. Détermination de l'activité cellulasique	21
3.4.4. Détermination de l'activité estérasique et lipasique	21
3.4.5. Détermination de l'activité protéasique.....	21
3.4.6. Détermination de l'activité amylasique.....	22
3.4.7. Détermination de l'activité phosphatasique.....	22
3.5. Caractérisation phénotypiques des souches sélectionnées.....	22
3.5.1. Coloration de Gram, la mobilité et test de catalase	22

Résultats

1. Caractères physico-chimiques.....	23
2. Criblage d'isolats bactériens producteurs de molécules antifongiques et à caractères PGP.....	24
3.1. Isolement et sélection des souches.....	24
3.2. Mise en évidence de l'activité antifongique	24
3.3. Production de HCN.....	26
3.4. Production d'ammoniac NH ₃	27
3.5. Production des substances volatiles.....	27
3.6. Production d'acide indole acétique (AIA).....	29
3.7. Activité enzymatique.....	30
3. Les caractères phénotypiques.....	32

Discussion

1. Caractères physico-chimiques	33
2. Mise en évidence de l'activité antifongique.....	33
3. Production de HCN.....	34

4. Production d'ammoniac.....	35
5. Production des substances volatiles.....	35
6. Production d'acide indole acétique (AIA).....	36
7. Activité enzymatique.....	36
7.1. Activité lipasique et estérasique.....	37
7.2. Activité amylasique.....	37
7.3. Activité chitinasique.....	38
7.4. Activité uréasique.....	38
7.5. Activité celulasique.....	38
7.6. Activité protéasique.....	39
7.7. Solubilisation des phosphates.....	39

<i>Conclusion.....</i>	<i>40</i>
-------------------------------	------------------

Références bibliographiques

Annexes

Introduction

En 2004, l'Organisation des Nations Unies (ONU) a estimé que vers la fin de l'année 2050 la population humaine va atteindre 8,9 milliard d'habitants sur terre. Cependant, ces présomptions ont été corrigées vers la fin de l'année 2015, signalant que notre planète est supposée abriter plus de 9,725 et 11,213 milliard d'habitants vers la fin des années 2050 et 2100, respectivement (UN. 2004 ; Ashraf et *al.*, 2012 ; UN. 2015). Cette augmentation de la population ajoutée à la salinisation des sols et à la dégradation de l'environnement a accentué les besoins nutritionnelles au niveau planétaire (Shahbaz et Ashraf, 2013).

L'agriculture constitue la source principale de nutrition pour l'humanité. Et pour satisfaire les besoins nutritionnels de cette population en augmentation continue, la production agricole doit subir une augmentation considérable. En prenant l'exemple de la production céréale, pour satisfaire la consommation humaine en 2025 en ces produits, la quantité produite doit augmenter de 585 à 828 millions de tonnes en représentant ainsi une augmentation de 42% (Ashraf et *al.*, 2012). Cependant, la production agricole est affectée par des stressés abiotiques (salinité, sécheresse, métaux lourds ...etc.) et stressés biotiques causés par les ravageurs de cultures (nématodes, protozoaires...etc.) et par des microorganismes phytopathogènes (virus, bactéries et champignons).

Pendant les trois dernières décennies, les agriculteurs sont devenus dépendants des produits chimiques comme méthodes relativement fiables de protection des récoltes contre les phytopathogènes (Jan et *al.*, 2011). Néanmoins, les effets néfastes qu'exercent ces produits chimiques sur la santé humaine (ils ont la faculté de persister en s'accumulant à diverses étapes de la chaîne alimentaire) et environnementale (en exposant la communauté microbienne bénéfique du sol à des concentrations excessives en produits chimiques), ajoutant à l'apparition de résistance chez les agents phytopathogènes vis-à-vis les composés chimiques utilisés, constituent des inconvénients majeurs pour la lutte chimique (Corbaz, 1990 ; Botelho et Mendonça-Hagler, 2006).

Ces inconvénients de la lutte chimique ont conduit à la recherche d'une méthode de lutte écologique et durable, et donc une méthode de lutte biologique. La lutte biologique repose principalement sur l'élimination d'un ravageur ou d'un agent pathogène par son ennemi naturel (Lepoivre, 2003).

Plusieurs travaux ont été rapportés sur l'utilisation des bactéries/rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes (PGPB/R) comme agents de lutte biologique et comme stimulateurs de la croissance des plantes (Jeon et *al.*, 2003 ; Dey et *al.*, 2004 ; Tabli et *al.*, 2014; Noumavo et *al.*, 2016).

Dans cette optique, notre travail a porté sur l'isolement de bactéries rhizosphériques productrices de substances antifongiques et stimulatrices de la croissance des plantes via quelques mécanismes (ex : production de l'AIA).

Le manuscrit est scindé en deux parties :

- Une partie bibliographique qui comprend une synthèse d'un ensemble de donnée sur les bactéries telluriques promotrices de la croissance des plantes (PGPB) et sur les champignons phytopathogènes
- Une partie pratique comprenant la partie matériel et méthodes et la partie résultats et discussion.
- Enfin, une conclusion qui retrace l'ensemble des résultats de ce travail réalisé.

Synthèse
Bibliographique

I- Les bactéries telluriques promotrices de la croissance des plantes (PGPB)

1. Le sol

Le sol est la couche supérieure de la croûte terrestre, composé de matière minérale, de matière organique, d'eau, d'air et d'organismes. Le sol provient de l'altération et de la transformation des roches sous l'action des changements climatiques, de l'atmosphère et des échanges d'énergie qui s'y manifestent (Barles et *al.*, 1999). Il est considéré comme un système dynamique complexe qui évolue en permanence sous le processus de biotransformation par les micro-organismes (bactéries, champignons, etc.) et de transfert des éléments ou des composés (Lynch, 1990).

1.1. La rhizosphère

Le terme « rhizosphère » dérive d'un mot grec « Rhizo »=racine et « Sphère »= champs d'influence (Morgan et *al.*, 2005). Selon Hiltner (1904), la rhizosphère est le volume du sol qui entoure les racines et dans lequel la microfaune est influencée par ces dernières. Elle est aussi définie comme étant la zone biologiquement active qui représente un habitat propice à la colonisation microbienne du sol où les interactions racines -microorganismes sont régulées par une variété de composés synthétisés, accumulés et sécrétés par les racines des plantes et qui agissent comme des attractants chimiques pour diverses communautés microbiennes hétérogènes (Prescott et Klein, 1999 ; Walker et *al.*, 2003 ; Ahmad et Kibert, 2013). Dans le sol, les bactéries sont les organismes les plus variés et les plus nombreux, leur densité est de l'ordre de 10^9 UFC par gramme du sol. Cependant, la densité des populations de la microflore associées aux racines est significativement plus élevée dans la rhizosphère que dans le sol nu (Davet, 1996 ; Van, 2007 ; Valencia, 2008).

1.2. Les Rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes (PGPR)

Le terme PGPR provenant de l'anglais « Plant Growth Promoting Rhizobacteria » désigne les bactéries qui exercent un effet bénéfique sur la croissance et le développement des plantes par différents moyens (Abnatura, 2013). Généralement, elles sont des souches très compétitives capables de coloniser le système racinaire des plantes riches en éléments nutritifs, leur abondance dans le sol s'explique par leur multiplication rapide et leur capacité à utiliser une grande variété de substrats comme source d'énergie et d'éléments nutritifs. Les PGPRs sont divisés en deux grands groupes en fonction de leur relation avec les plantes hôtes : les bactéries libres (non rhizosphériques), vivants dans le sol et n'utilisant pas les

exsudats racinaires pour leur croissance et les bactéries symbiotiques à effet direct sur les composés organiques présents dans les racines. Les PGPRs forment un groupe hétérogène de bactéries dont les genres les plus étudiés sont: *Agrobacterium*, *Arthrobacter*, *Azotobacter*, *Enterobacter*, *Bacillus*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Pseudomonas* et *Rhizobium* qui favorisent la croissance des plantes par des mécanismes directs et/ou indirects (Kloepper et al., 1999 ; Barraquio et al., 2000 ; Ahmad et al., 2008 ; Wang et al., 2014).

2. Mécanismes impliqués dans la stimulation de la croissance des plantes par les PGPR

Les PGPR influencent la santé des plantes et la productivité par une variété de mécanismes qui impliquent la solubilisation des minéraux, l'apport d'éléments nutritifs, la stimulation de la croissance des racines, la suppression des maladies racinaires (Martinez-Viveros et al., 2010), la synthèse d'enzymes hydrolytiques, l'élimination des agents phytopathogènes à travers la compétition et l'induction des mécanismes de résistance de la plante (Antoun et Prévost, 2005). Ces mécanismes influencent la croissance des plantes par action directe ou indirecte (Kloepper, 1993 ; Glick et al., 1999 ; Vessey, 2003 ; Martinez-Viveros et al., 2010).

2.1. Les mécanismes directs

La promotion directe de la croissance des plantes peut se produire par plusieurs processus :

2.1.1. Fixation d'azote

L'azote constitue le plus souvent un facteur limitant, il se trouve fréquemment sous forme gazeuse (N_2), inaccessible aux animaux et aux plantes où aucune espèce végétale n'est capable de fixer l'azote atmosphérique et de l'utiliser directement pour sa croissance (Pujic et Normand, 2009 ; Arora et al., 2012). Les PGPRs les plus connus pour leur rôle de stimulation des plantes grâce à leur capacité de fixer l'azote atmosphérique sont : *Azoarcus sp.*, *Burkholderia sp.*, *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum* ; *Azotobacter Paenibacillus* et *Azospirillum brasilense*, qui transforment l'azote atmosphérique en ammoniac en utilisant un système enzymatique complexe connu sous le nom de la nitrogénase (Weyens et al., 2010 ; Arora et al., 2012).

2.1.2. Solubilisation du phosphate

Le phosphore constitue l'élément le plus important après l'azote, c'est le nutriment vital pour la croissance et la productivité des plantes qui sont capables seulement d'absorber les formes solubles mono- et dibasiques. Il joue un rôle primordial dans les processus métaboliques (La photosynthèse, le transfert d'énergie, biosynthèse macromoléculaire et la respiration), il est présent sous forme insoluble, immobilisé et précipité. Par ailleurs, les microorganismes solubilisant le phosphate sont abondants dans le sol et dans la rhizosphère de la plupart des plantes, ils convertissent les phosphates insolubles en forme soluble, en libérant le phosphate lié par solubilisation et minéralisation, et ceci est réalisé grâce à l'acidification, la chélation et la production d'acides organiques tels que l'acide gluconique. Les espèces appartenant aux genres bactériens comme : *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Rhodococcus* et *Serratia* ont la capacité de solubiliser le phosphate dans le sol (Arora et al., 2012 ; Bhattacharyya et al., 2012 ; Gupta et al., 2015).

2.1.3. La production de sidérophores

Le fer est l'un des oligoéléments les plus importants pour la croissance microbienne, il agit comme un régulateur global de nombreux processus cellulaires, métaboliques et biosynthétiques. Dans des conditions de carence en fer, les bactéries aérobies produisent des métabolites secondaires appelés sidérophores. Bien que les champignons phytopathogènes synthétisent des sidérophores, ceux-ci ont généralement une faible affinité pour le fer par rapport à ceux produits par les PGPRs (Schippers et al., 1987 ; Briat, 1992; Ratul, et al., 2012).

Les sidérophores fixent le fer ferrique (Fe^{3+}) et le transforment en sa forme soluble qui est le fer ferreux (Fe^{2+}). Ils sont également utilisés dans la lutte biologique contre les champignons phytopathogènes en s'appropriant des ions ferriques présents dans la rhizosphère, ils les rendent non disponibles aux champignons pathogènes, ce qui provoque une diminution de leur croissance (Glick et Pasternak, 1998 ; Ongena et al., 2002).

2.1.4. La production des phytohormones

Il existe deux sources de phytohormones naturellement disponibles pour les plantes : production endogène par les tissus de la plante et exogène par des micro-organismes associés. Les PGPRs produisent différentes phytohormones comme : l'AIA (Acide indole acétique : auxines), l'acide gibbérellique et les cytokinines. Ce sont des petites molécules de signal

produites en très faible concentration influençant les processus biochimiques, physiologiques et morphologiques dans les plantes (Han et *al.*, 2005 ; Baca et Elmerich, 2007 ; Kloepper et *al.*, 2007 ; Martínez-Viveros¹ et *al.*, 2010).

L'auxine est la plus importante des hormones de croissance des plantes. Elle est impliquée dans plusieurs processus, y compris la division cellulaire, la différenciation et la formation de faisceaux vasculaires, et elle a un effet positif sur l'initiation de la croissance et l'élongation des racinaires. Elle augmente également la ramification des racines et améliore l'absorption de minéraux et d'eau (Paten et Glick, 2002 ; Ahmad et Kibret, 2013 ; Gupta et *al.*, 2015).

Les cytokinines et les gibbérellines sont aussi des phytohormones impliquées dans la modification de la morphologie des plantes et la stimulation de la croissance de la partie aérienne (Van Loon, 2007). Les Gibbérellines ou (acide gibbérellique) forment le groupe de phytohormones impliqué dans la modification de la morphologie de la plante par l'extension des tissus, en particulier de la tige. Ils affectent les processus de reproduction dans une large variété de plantes et retarde la sénescence des fruits et des feuilles. Les cytokinines sont retrouvées dans les racines, les tiges, les feuilles, les fleurs, les fruits et les graines, mais une forte évidence indique que la racine est le site principal de la biosynthèse de cytokinines (Hopkins, 2003 ; De Salamone et *al.*, 2005).

L'éthylène est un régulateur impliqué dans la stimulation de la croissance des plantes à des concentrations modérées. Dans les conditions du stress (salinité, pollution par les métaux lourds...etc.), la plante augmente la sécrétion de l'éthylène, ce qui induit l'inhibition de la croissance des racines (Saleem et *al.*, 2007).

2.2. Les mécanismes indirects

Le principal avantage de l'utilisation des PGPRs est la résistance conférée aux plantes contre les maladies causées par les agents pathogènes. Les rhizobactéries jouent un rôle majeur dans la lutte contre ces agents, où un large spectre des maladies bactériennes, fongiques et parasitaires est supprimé via la production d'antibiotiques, compétition (pour les éléments nutritifs, l'oxygène et l'espace), l'activation de la résistance systémique induite (ISR) et la production des enzymes (chitinase, protéase, lipase), cette protection est nommée biocontrôle.

De plus, les PGPRs peuvent être utilisées comme un biofertilisant efficace dans l'amélioration du rendement des cultures par la production d'enzymes telles que (cellulases, amylases, etc.) (Lugtenberg et Kamilova, 2009 ; Glick, 2012 ; Tariq et *al.*, 2014).

2.2.1. La compétition

La compétition pour l'espace et les nutriments est un mécanisme biologique utilisé par les PGPRs pour éliminer les phytopathogènes. Cette compétition entre deux ou plusieurs microorganismes concerne soit les éléments nutritifs, l'espace ou les autres facteurs environnementaux qui deviennent limitatifs pour leur croissance (Dommergues et Mangenot, 1970 ; Shameer et Prasad, 2017). Un agent antagoniste efficace doit être un colonisateur agressif capable d'utiliser rapidement et efficacement les éléments nutritifs présents en faible concentration dans le sol, cette interaction entre les bactéries bénéfiques et les pathogènes est influencée par la densité et l'intensité de l'activité des rhizobactéries (Jijakli, 2003 ; Podile et Kishore, 2006).

2.2.2. L'Antibiose

La production d'antibiotiques est l'un des mécanismes utilisés par les PGPRs dans la prévention des attaques pathogènes et dans la suppression des maladies d'origine biotique. C'est le mode d'action le plus étudié chez les agents de la lutte biologique (Jijakli, 2003). Il consiste à produire des antibiotiques efficaces contre l'agent pathogène par l'agent antagoniste. Ces molécules bioactives sont des métabolites secondaires à faible poids moléculaire tels que les antibiotiques tel que l'amphicine, le 2,4-diacétylphloroglucinol (DAPG), cyanure d'hydrogène (HCN) et la phénazine qui agissent comme des facteurs contre l'attaque des pathogènes (Corbaz, 1990 ; Babalola, 2010 ; Shameer et Prasad, 2017). Certains métabolites interférents avec la germination, la croissance mycélienne et/ou la sporulation des agents phytopathogènes, ces molécules bioactives vont ralentir ou arrêter la croissance de l'agent pathogène (Jijakli, 2003).

2.2.3. Le parasitisme

Ce mécanisme de lutte consiste en une interaction directe entre deux microorganismes où les tissus vivants de l'un constituent une base nutritive pour l'autre (Helluy et Holmes, 2005). Il implique l'invasion des cellules de l'agent pathogène par le microorganisme antagoniste. L'agent antagoniste utilisera des enzymes lytiques telles que les glucanases, les chitinases et les lysozymes pour dégrader les parois de l'agent pathogène (Corbaz, 1990).

2.2.4. La Résistance systémique induite « ISR »

L'expression de mécanismes de défense systémique chez les plantes peut être initiée suite à l'interaction avec certaines rhizobactéries non pathogènes lors d'un phénomène appelé ISR (Induced Systemic Resistance), ce mécanisme rend la plante plus résistante contre d'éventuelle attaque des agents pathogènes (virus, bactéries et champignons). De nombreux composants bactériens tel que les lipopolysaccharides (LPS), sidérophores, lipopeptides cycliques, peuvent induire une résistance systémique des plantes (Gupta et *al.*, 2015 ; Shameer et Prasad, 2017).

2.2.5. La Production d'enzymes hydrolytiques

L'amélioration de la croissance par l'activité enzymatique est un mécanisme utilisé par les PGPRs, ces enzymes jouent un rôle clé dans le processus global de la décomposition de la matière organique dans les écosystèmes en protégeant ainsi les plantes des stressés biotiques et abiotiques. Les rhizobactéries favorisant la croissance des plantes peuvent produire certaines enzymes telles que les chitinases, lipases, phosphatases, protéases, etc. (Nadeem et *al.*, 2013).

a. Activité cellulasique

Les cellulases sont des enzymes inductibles synthétisées par une grande diversité de microorganismes comprenant les champignons et les bactéries pendant leur croissance sur les matériaux cellulotiques, ces enzymes ont constitué une cible pour les recherches académiques aussi bien industrielles (Sukumaran et *al.*, 2005).

b. Activité amylasique

L'amylase est une enzyme hydrolysant l'amidon. Elle est constituée d'une α -amylase et d'une β -amylase (Pandey et *al.*, 2000). La synthèse des enzymes amylasiques par les bactéries permet une dégradation de la matière organique dans la nature et fournir des éléments minéraux que les plantes vont utiliser pour leur croissance. Les enzymes amylolytiques sont d'importance cruciale en biotechnologie avec une large applications dans les différentes industries : alimentaire, textile et papetière (Raj et *al.*, 2009).

c. Activité chitinasique

La chitine est le principal constituant des parois cellulaires de la majorité des champignons (Patel et *al.*, 2010). Les microorganismes producteurs de chitinases sont

qualifiés comme agents de biocontrôle contre plusieurs maladies fongiques des plantes, grâce à leur capacité de dégrader les parois cellulaires des champignons pathogènes (Kim et *al.*, 2003).

d. Activité phosphatasique

Le phosphore est un élément essentiel pour tous les êtres vivants en étant un composant structural et fonctionnel des organismes. Les phosphatases constituent un large groupe d'enzymes hydrolysant des esters et des anhydrides de l'acide phosphorique, ces enzymes jouent un rôle essentiel dans le cycle du phosphate et jouent un rôle principal dans l'activité biologique du sol (De et *al.*, 2011).

e. Activité protéasique

Les protéases jouent un rôle significatif dans la minéralisation de l'azote dans le sol. C'est un processus important dans la disponibilité de l'azote et donc dans la croissance des plantes. (Petit et Jobin, 2005 ; Nannipieri et *al.*, 2011). L'activité protéasique influence indirectement la synthèse des auxines en libérant les acides aminés comme le tryptophane qui est le précurseur de la synthèse de l'AIA et d'autres substances appariées (Mansour et *al.*, 1994). Ils jouent également un rôle important dans la lyse de la paroi cellulaire des champignons phytopathogènes. Certaines des protéases sont impliquées dans l'inactivation des enzymes extracellulaires des champignons phytopathogènes (Elad et Kapat ,1999).

f. Activité uréasique

L'uréase est responsable de l'hydrolyse de l'urée pour produire le CO₂ et l'ammoniac (NH₃), ce qui augmente la disponibilité de l'azote pour les plantes, cette activité est très sensible aux concentrations toxiques des métaux lourds et les facteurs environnementaux (Yang et *al.*, 2006 ; Martinez-Salgado et *al.*,2010).

g. Activité lipasique

La production de lipases est influencée par la nature et la disponibilité de la source de carbone et d'azote. Les lipases peuvent agir en tant qu'hydrolases en milieu aqueux ou comme catalyseurs en synthèse organique. En tant qu'hydrolases, elles sont responsables du catabolisme des triglycérides et leurs substrats préférentiels qui sont les acides gras et le glycérol. (Guzmán et *al.*, 2008).

II - Les champignons phytopathogènes

La croissance des plantes est fortement influencée et affectée par de nombreux facteurs, abiotiques (physico-chimiques) tels que la salinisation et la sécheresse des sols qui limitent la productivité végétale et le rendement agricole, et des facteurs biotiques (suite à l'intervention d'organismes vivants) tels que les : virus, bactéries, nématodes et champignons (Hamdy, 1999 ; Baatour *et al.*, 2004). Selon (Belabid *et al.*, 2004), la majorité des maladies des plantes sont causées par les champignons phytopathogènes, car ils sont responsables d'environ 70 % des maladies des plantes cultivées (Arora, 2003) et les pertes économiques sont énormes, dont, d'après la FAO (1999), les maladies phytopathogènes réduisent de 12 à 14% la production agricole mondiale.

1. Les champignons phytopathogènes

Les champignons sont des organismes eucaryotes, filamenteux, multicellulaires, et les levures, hétérotrophes qui produisent un réseau d'hyphes appelé mycélium et absorbent les nutriments du substrat environnant. Presque tous les champignons du sol sont nécrotrophes, ce qui signifie qu'ils détruisent les tissus de l'hôte avec des enzymes et des toxines avant les hyphes et ne nécessitent pas de cellule vivante pour obtenir des nutriments (Alexopoulos *et al.*, 1996), ils sont capables d'infecter n'importe quel tissu à n'importe quel stade de la croissance des plantes et ils montrent des cycles de vie complexes, y compris des stades de reproduction sexuée et asexuée (Agrios, 2005).

2. Les moyens de lutte

Les méthodes utilisées pour protéger les plantes contre les maladies phytopathogènes varient en fonction de la plante hôte, de type du pathogène, de l'interaction entre les deux et des conditions environnementales. Le but final de toutes les méthodes utilisées est de combattre les maladies des plantes spécialement les champignons phytopathogènes et alors d'accroître et d'améliorer la qualité et la quantité de la production agricole (Nasraoui, 2006).

2.1. La lutte physique

Différents moyens physiques et mécaniques peuvent être utilisés pour éliminer ou limiter le développement de certains champignons phytopathogènes tels que la température (basse et élevée), l'air sec, la lumière et les radiations. Cependant, ces moyens ne suffisent pas pour protéger totalement les cultures, C'est pourquoi ils sont généralement associés à d'autres moyens de lutte (Nasraoui, 2006).

2.2. La lutte culturale

Les techniques culturales visent à prévenir le contact avec le pathogène ou au moins d'éviter des conditions favorables à l'infection des plantes cultivées (Walters, 2009). Parmi ces pratiques, la réduction de l'intensité de la lumière dans les tunnels en plastique absorbant les UV pourrait réduire l'infection et la sporulation des champignons pathogènes, rectifier le taux d'humidité et l'aération dans le but défavoriser l'évapotranspiration et éviter l'accumulation d'eau au niveau des racines (Nicot et *al.*, 1996 ; Tozlu, 2006).

2.3. La lutte chimique

La lutte chimique se définit par l'utilisation de fongicides pour détruire, affaiblir, ou réprimer les champignons (Ajouz, 2009). Les fongicides sont utilisés pour lutter contre les champignons en pré- et post-récolte afin d'assurer une production agricole suffisante (Leroux, 2007 ; Barakat et Al-Masri, 2017).

Les fongicides chimiques donnent de bons résultats à court terme, mais leur utilisation croissante entraîne plusieurs effets négatifs, à savoir le développement de la résistance chez les champignons phytopathogènes *vis-à-vis* des produits chimiques appliqués, leurs impacts environnementaux non ciblés, leur accumulation ou l'accumulation de leurs résidus dans l'environnement qui présente un danger qu'on ne peut plus négliger (Corbaz, 1990 ; Toussaint, 1996). Il existe également un certain nombre de maladies pour lesquelles les solutions chimiques sont rares, inefficaces ou inexistantes, en outre, le coût élevé des fongicides, la demande des consommateurs pour des produits alimentaires « BIO », leur incompatibilité avec l'agriculture durable ont fait que leur utilisation est devenue de plus en plus interdite et l'intérêt pour d'autres alternatives a ainsi augmenté (Mouden et *al.*, 2010 ; Mouria et *al.*, 2013 ; Compant et *al.*, 2015). Le contrôle biologique est donc considéré comme une alternative prometteuse ou un moyen supplémentaire pour réduire l'utilisation de produits chimiques dans l'agriculture (Compant et *al.*, 2015).

2.4. La lutte biologique

La lutte biologique peut être définie comme étant le contrôle d'un ravageur par son ennemi naturel sans avoir des effets néfastes sur la plante (Lepoivre, 2003). Elle est naturellement présente dans la plupart des écosystèmes. Elle peut être utilisée volontairement en agriculture, entre autres en remplacement des pesticides conventionnels. En comparaison à ces derniers la lutte biologique est beaucoup plus écologique (Moëne-Loccoz et *al.*, 2001).

Elle consiste à réduire la densité d'un agent pathogène et/ou l'activité de celui-ci en mettant en œuvre un ou plusieurs organismes autre que l'Homme. Les agents du biocontrôle

sont perçus comme moins exigeants à l'environnement, et leur mode d'action est généralement complexe réduisant les risques de développement de la résistance (Cook et Baker, 1984). Les agents de lutte biologique peuvent être : des composés minéraux et organiques (ex : le chitosan), des extraits de plantes (ex : la propolis, le resvératrol), des extraits d'algues et des agents microbiens (ex : champignons filamenteux, levures et bactéries) (Ajouz, 2009). Ces derniers (agents microbiens) sont les plus étudiés et peuvent être sélectionnés comme agents de lutte en se basant sur leur antagonisme à l'égard les champignons phytopathogènes (Piyanoot et *al.*, 2018).

2.4.1. Mécanismes d'action d'un agent de lutte biologique

Les mécanismes d'action des agents de lutte biologique sont : la compétition (pour les éléments nutritifs, l'oxygène et l'espace), l'antibiose, le parasitisme et la diminution de l'agressivité du pathogène et l'induction de la résistance chez la plante. (Ces mécanismes sont détaillés dans la partie bibliographique).

L'étude de ces mécanismes d'action est une étape importante dans le développement de la lutte biologique (Jijakli, 2003).

2.4.2. Les critères de sélection des agents de la lutte biologique

Selon Jijakli (2003), les agents de la lutte biologique doivent répondre à certains critères tels que la capacité de survie et d'adaptation aux différentes conditions environnementales, l'absence de la production de métabolites secondaires toxiques ou de caractère pathogène, une faible exigence nutritionnelle avec une efficacité à faible concentration sur un grand nombre de pathogènes et d'hôtes, mais le critère le plus important se base la production qui doit être aisée et peu coûteuse.

Matériel et Méthodes

1. Echantillonnage :

Dans le but de rechercher des bactéries stimulatrices de la croissance des plantes et productrices de molécules antifongiques éliminant les phytopathogènes, 8 prélèvements sont effectués aseptiquement à partir des sols rhizosphériques des terres agricoles dans la wilaya de Bejaia et d'Alger durant le de mois de Mars 2018. Les 8 échantillons rhizosphériques sont récupérés dans des sacs stériles et immédiatement transportés au laboratoire dans une glacière à 4°C afin de déterminer leurs propriétés physicochimiques et pour l'isolement de bactéries.

Ce travail est réalisé durant une période de 4 mois (Mars-Juin) au niveau du laboratoire de Maîtrise des Energies Renouvelables (LMER)-Equipe de Biomasse et Environnement de l'université Abderrahmane Mira de Bejaïa.

Le **tableau I** suivant englobe les codes, le type des échantillons et les lieux de prélèvements :

Tableau I : Codes et lieux de récupération des échantillons utilisés pour l'isolement.

Echantillon	Lieu de prélèvement	Type de prélèvement
A	Meghra (Bejaia)	Rhizosphère du radis
B	Meghra (Bejaia)	Rhizosphère de la tomate
C	Meghra (Bejaia)	Rhizosphère du trèfle
D	Meghra (Bejaia)	Rhizosphère de la fève
E	Ain El-Beniane Alger	Rhizosphère de la fève
G	Ain El-Beniane Alger	Rhizosphère de la tomate
K	Ain El-Beniane Alger	Rhizosphère de vigne
N	Ain El-Beniane Alger	Rhizosphère de la laitue

2. Caractérisation physicochimiques des échantillons du sol

2.1. Le contenu humide gravimétrique

Dans les analyses microbiennes, la teneur en eau du sol est habituellement exprimée en fonction de la teneur en humidité gravimétrique « θ_g » qui, comme son nom l'indique, est la masse d'eau par unité de masse de sol sec.

Une masse initiale connue de chaque échantillon est séchée dans un four à une température comprise entre 165°C et 175°C, et pesée à plusieurs reprises jusqu'à l'obtention d'un poids constant. La valeur du contenu humide gravimétrique est déterminée selon (Peppe et Gerba, 2004) selon la formule suivante :

$$\theta_g = \frac{m-d}{d}$$

θ_g : contenu humide gravimétrique

m : la masse initiale d'un sol à l'état humide

d : la masse de ce même sol à l'état sec

2.2. pH

L'acidité d'un sol est déterminée par sa teneur en ions H^+ . Les valeurs pH-eau (acidité effective) des échantillons du sol ont été déterminées selon le protocole suivant : 25 ml d'eau distillée sont ajoutés à 10g de l'échantillon du sol préalablement tamisé (<2mm) et séché à 40°C dans un Bécher. L'ensemble est agité pendant une heure. L'électrode d'un pH-mètre (Hanna Instrument-HI 2210) est plongée dans la solution pour la lecture des valeurs du pH (Rouiller et *al.*, 1994).

2.3. Conductivité électrique

La conductivité électrique d'un sol est considérée comme un indicateur de sa salinité, plus un sol est salin, plus il devient conductible. Pour déterminer la conductivité électrique d'un échantillon du sol, 10g de ce dernier sont ajoutés à 50 ml d'eau distillée, le mélange est agité pendant 30 mn puis laissé décanter. La mesure de la conductivité électrique (EC) est ensuite effectuée à l'aide d'un conductimètre (Hanna Instruments-HI 98129) à partir du surnageant (Hardi et Doyle, 2012).

2.4. Matière organique totale

Dans un bécher de 250ml, 1g de chaque échantillon est pesé puis ajouté à 10ml d'eau distillée et 10ml d' H_2O_2 (30%). Ensuite, le bécher sera recouvert avec du papier aluminium. Si la réaction n'est pas trop vigoureuse, le bécher serait placé sur un bain de vapeur et laissé jusqu'à la fin de la réaction (plus de bulles qui se forment). La digestion se termine habituellement dans une heure. Le contenu du bécher sera manuellement mélangé durant la réaction afin d'amener les particules les plus légères de la matière organique en contact avec la

solution. A la fin de la digestion, l'échantillon sera séché à 105°C puis pesé à plusieurs reprises jusqu'à la stabilisation du poids (Huang et *al.*, 2009).

La proportion de la matière organique est déterminée par la formule suivant :

$MOT(\%) = P_{sec} / P_{original}$. Où :

- MOT : Matière Organique Totale,
- P_{sec} : la masse de l'échantillon avant traitement,
- $P_{original}$: la masse de l'échantillon après traitement et séchage.

3. Criblage d'isolats bactériens producteurs de molécules antifongiques et à caractères PGP

3.1. Isolement de souches

L'isolement des bactéries est effectué par la méthode des suspensions-dilutions selon le protocole suivant :

3.1.1. Préparation des dilutions :

Pour chaque échantillon, 1 g de sol est additionné de 9 ml de PBS puis agité à l'aide d'un vortex à température ambiante. Ensuite, des tubes à essais contenant 9mlde PBS sont préparés. Des dilutions décimales successives (jusqu'à 10^{-6}) sont préparées.

3.1.2. Ensemencement des boîtes et mise en incubation :

Le milieu de culture Plate Count Agar (PCA) est utilisé pour l'isolement des bactéries à partir des dilutions préparées. Des boîtes de Pétri contenant le milieu PCA sont ensemencées par inondation avec 1 ml de chaque dilution puis incubées à 30°C/ 24 à 48 h.

3.1.3. Purification :

A la fin de l'incubation, les colonies ayant montré des aspects différents sont repiquées sur le même milieu de culture, codifié, puis conservées pour faire l'objet d'autres tests.

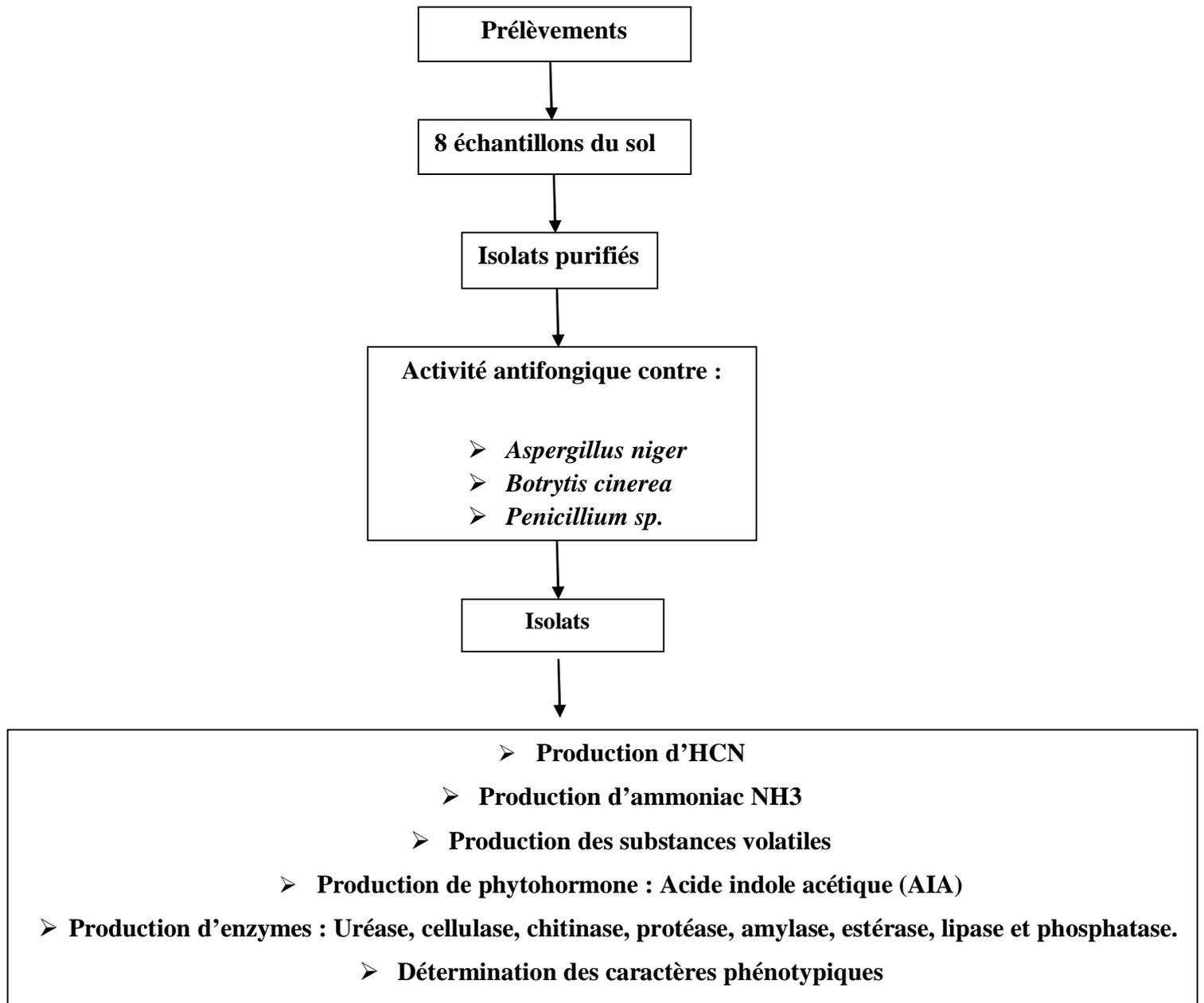


Fig. 1 : Étapes de la sélection des isolats bactériennes

3.2. Mise en évidence de l'activité antifongique

Tous les isolats bactériens obtenus sont testés pour leur capacité à produire des substances antifongiques à l'égard de trois champignons phytopathogènes, qui sont *Botrytis cinerea*, *Aspergillus niger* et *Penicillium sp.* Fournis par le laboratoire de Maîtrise des Energies Renouvelables (LMER)-Equipe de Biomasse et Environnement de l'université Abderrahmane Mira de Bejaïa.

Les 3 champignons sont repiqués sur gélose à l'extrait de Malt dans le but d'obtenir des cultures jeunes. Un disque de gélose de 5mm de diamètre de la culture de chaque champignon est déposé au centre de la gélose à l'extrait de malt. Chaque culture bactérienne est déposée en 3 disques à une distance de 2,5 cm du champignon. Un témoin négatif de la souche fongique est testé en absence de bactéries. Les boites ont été incubées à 25°C/5- 7jours selon la vitesse de croissance du champignon.

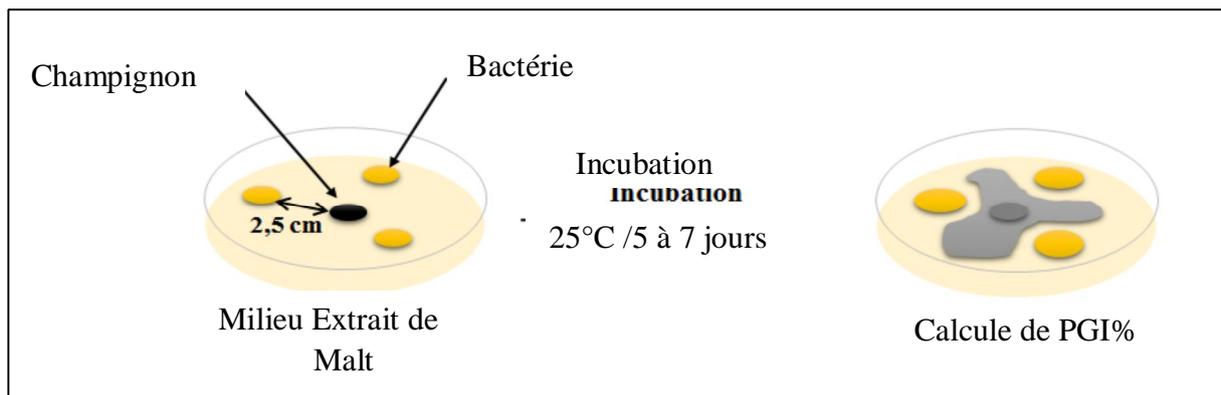


Fig. 2 : Mise en évidence de l'effet des isolats bactériens sur la croissance des champignons.

La capacité de chaque isolat bactérien à inhiber la croissance mycélienne est déterminée en calculant le pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne (PGI%) selon la formule décrite par Saddiki (1999) :

$$\text{PGI}\% = \frac{\text{KR} - \text{R1}}{\text{KR}} \times 100$$

KR : Distance en mm entre le point du dépôt du champignon et la marge de la colonie contenue dans le témoin.

R1 : Distance en mm entre le point dépôt du champignon et la marge de la colonie contenue dans la boîte de pétrie traitée.

A la fin de ce test, les isolats ayant exhibé un effet positif en inhibant la croissance mycélienne sont sélectionnés pour subir d'autres tests, à savoir : la production de l'HCN, d'ammoniac (NH_3), de substances volatiles à effet antifongique, leur capacité à produire de l'AIA, la production d'enzymes hydrolytiques et leur capacité à solubiliser le phosphate.

3.2.1. Production de HCN

La production d'HCN a été recherchée suivant le protocole de Lorck (1948). Sur une gélose nutritive additionnée de 4.4g/l de glycine préalablement filtrée, les isolats bactériens sont ensemencés par stries, un disque de papier Whatman saturé en picrate alcalin (5% d'acide picrique et de 2% de carbonate de sodium anhydre) est déposé dans les couvercles des boîtes, ces dernières sont scellées avec du parafilm et incubées inversées à 30°C/96 h. Le virage de la couleur du papier Whatman du jaune vers l'orange ou le marron indique la production de l'HCN.

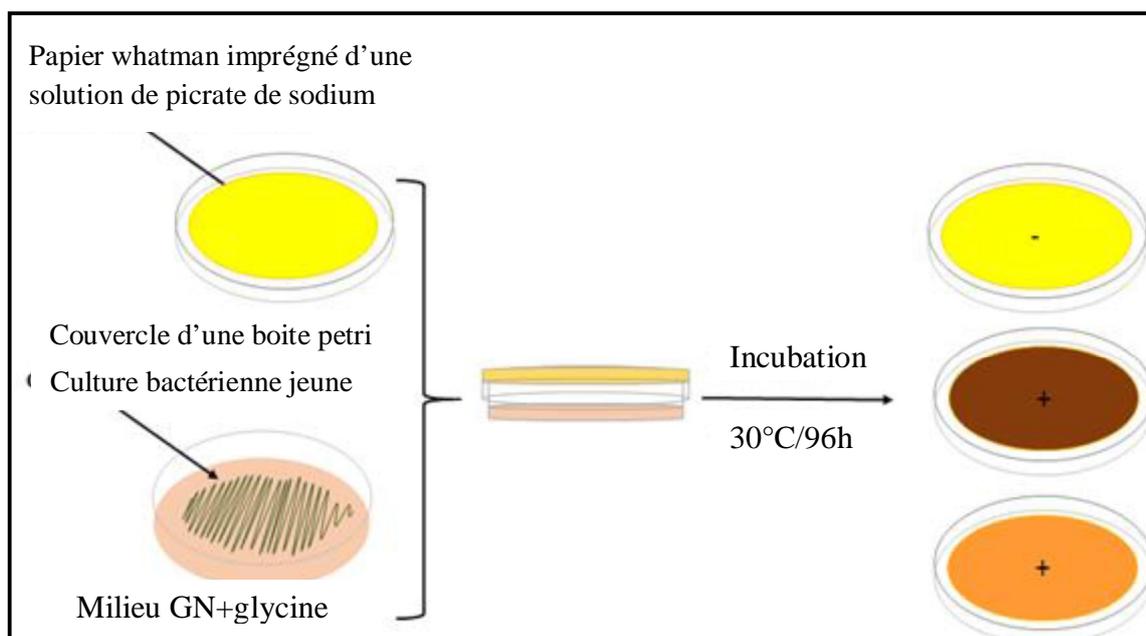


Fig. 3 : Production de Cyanure d'hydrogène (HCN)

3.2.2. Production d'ammoniac NH_3

Ce test qualitatif est réalisé selon la méthode de Capuccino et Sherman (1992). Il consiste à inoculer 100 μl de la suspension bactérienne dans 10 ml d'eau peptonée. Après

incubation à 30°C /96 h, 500µl du réactif de Nessler sont ajoutés dans chaque tube d'eau peptonée. Le développement d'une couleur jaune ou orange indique la production de NH₃.

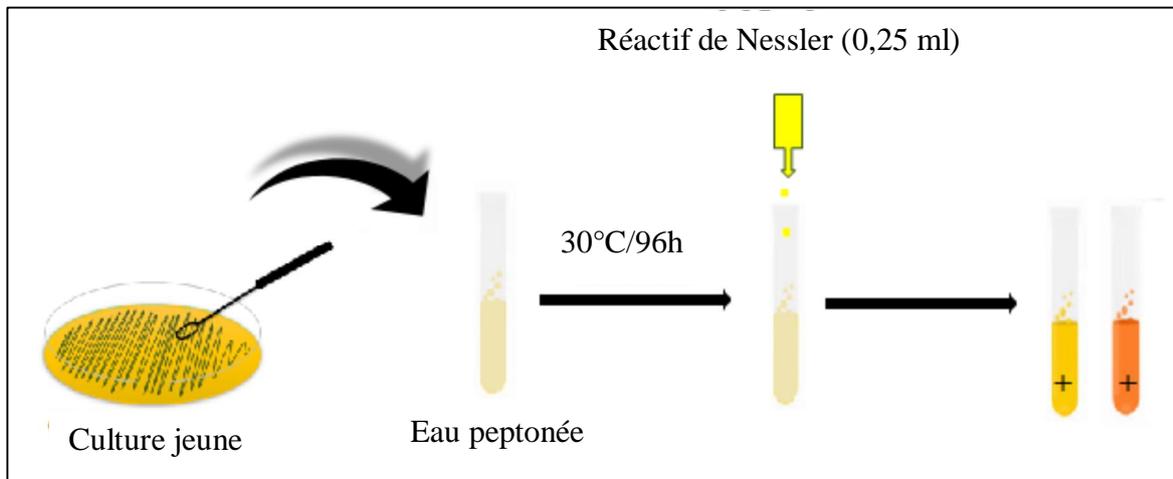


Fig. 4 : Recherche de la production d'ammoniac

3.2.3. Production des substances volatiles

La production de substances volatiles à activité antifongique par les isolats sélectionnés est recherchée par la méthode de Dennis et Webster (1971). Une boîte de Pétri contenant l'extrait de malt est inoculée avec un disque de 5 mm de diamètre du champignon, cette boîte sera superposée sur une seconde boîte de Pétri contenant le milieu PCA ensemencé par la souche bactérienne. Les deux boîtes sont scellées avec du parafilm et incubées à 25°C±2°C/5-7J.

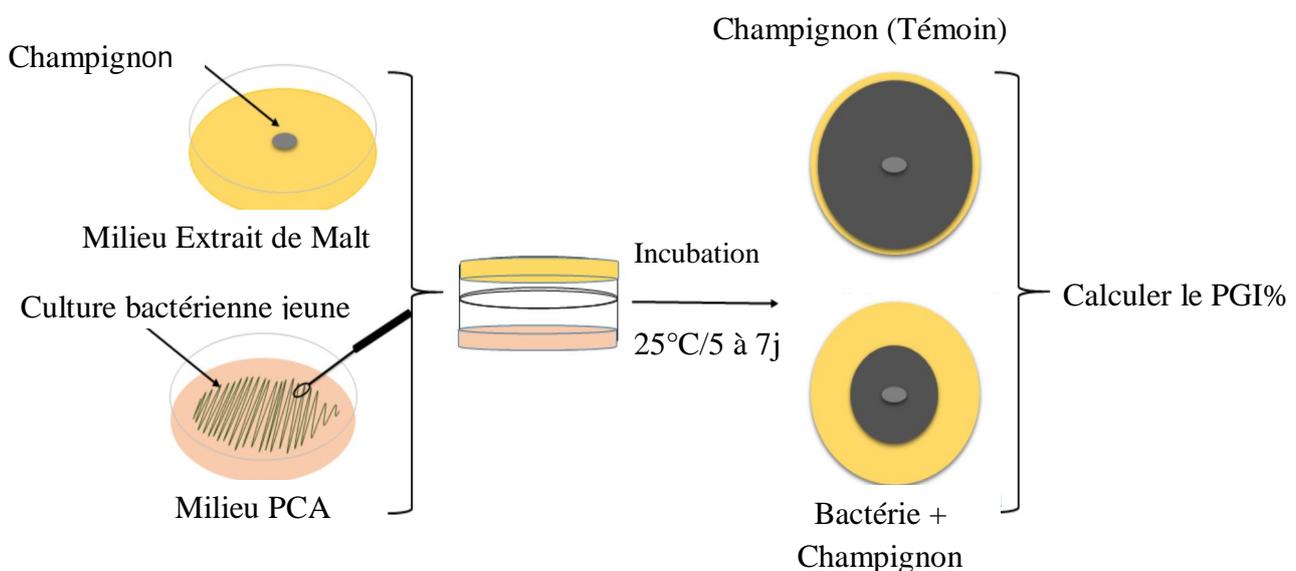


Fig.5 : Recherche de la production de molécules ammoniacales volatiles

Le pourcentage d'inhibition est calculé par la formule suivante :

$$n = [(a-b)/a] \times 100$$

n : Pourcentage d'inhibition des champignons testés (%).

a : Diamètre moyen du mycélium dans la boîte de témoin (cm).

b : Diamètre moyen du mycélium dans les boîtes contenant les bactéries (cm).

3.3. Production d'acide indole acétique (AIA)

La production d'AIA (auxines) par les bactéries sélectionnées est déterminée selon la méthode de Bric et al (1991). Les bactéries sontensemencées sur milieu Luria Bertani (LB) supplémenté de 0,5% de glucose et de 0,5mg/ml de tryptophane. Ce dernier est préalablement filtré à travers une membrane millipore (0.22 µm) et ajouté au milieu après autoclavage. Après une incubation à 28°C/72 h sous agitation, les cultures sont centrifugées à 1000 tr/min/15min. Après centrifugation, 1ml du filtrat est récupéré et additionné de 2 ml du réactif de Salkowsky (150 ml H₂SO₄ 98% + 250 ml H₂O+ 7,5 ml FeCl₃ 0,5M). Le mélange est ensuite incubé à l'obscurité pendant 20min. Le développement d'une couleur rose est l'indicateur de la production d'AIA. L'absorbance de la coloration rose apparue est mesurée par spectrophotomètre à 530 nm. Les valeurs d'AIA produit par chaque souche sont calculées par extrapolation sur une courbe standard préparée de la même façon avec de l'AIA pure (Sigma-Aldrich ®) (Bric *et al.* 1991).

3.4. Activités enzymatiques

Dans le but de déterminer l'utilité des isolats dans la lutte contre les champignons phytopathogènes et la fertilisation des sols, plusieurs enzymes sont recherchées. La méthode des cylindres d'agar est appliquée dans tous ces protocoles.

3.4.1. Détermination de l'activité uréasique

Cette activité est recherchée sur un milieu contenant en g / 950 ml d'eau distillée, peptone (1) ; glucose (1) ; NaCl (5) ; Na₂HPO₄ (1,2) ; KH₂PO₄ (0,8) ; rouge de phénol (0,012) ; Agar (15). Le milieu est ajusté à pH 6,8. Après autoclavage, 50 ml d'une solution d'urée à 40%,

préalablement stérilisée par filtration (porosité 0.22 μm), est ajoutée au milieu. L'activité uréasique est traduite par la présence d'un halo rose autour des colonies (Christensen, 1946).

3.4.2. Détermination de l'activité chitinasique

Le milieu utilisé est composé en g/l de : la chitine colloïdale : (0,6 - 0,8) ; K_2HPO_4 (2,7) ; KH_2PO_4 (0,3) ; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,7) ; NaCl (0,5) ; KCl (0,5) ; Extrait de levure (0,13) ; Agar (15) a été utilisé. L'incubation dure 7 jours au minimum à 30°C. L'activité chitinasique se manifeste par l'apparition d'un halo transparent autour des disques (Kopečný et al., 1996).

3.4.3. Détermination de l'activité cellulasique

Le milieu utilisé est celui de Carder (1986) contenant en g/l : Na_2HPO_4 (6) ; KH_2PO_4 (3) ; NaCl (0,5) ; NH_4Cl (1) ; Extrait de levure (3) ; CMC (5) ; Agar (15). Les boîtesensemencées sont incubées à 30°C /8 jours (Carrim et al., 2006). A la fin de l'incubation, une solution aqueuse de rouge de Congo (1%) est ajoutée à la surface des colonies, après 20 min, la surface est inondée par une solution de NaCl à 1M puis conservée une nuit à 5°C. L'activité cellulasique se traduit par l'apparition d'un halo clair autour des cylindres.

3.4.4. Détermination de l'activité estérasique et lipasique

La recherche de ces deux activités est effectuée sur milieu de culture décrit par Sierra (1957) qui contient en g/l : peptone (10) ; NaCl (5) ; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0.1) ; Agar (18), le Tween 80 (1%, v/v) est ajouté pour révéler l'activité estérasique, tandis que le Tween 20 est utilisé pour mettre en évidence l'activité lipolytique. Le pH est ajusté à 7,4 (Carrim et al. 2006). Après ensemencement, les boîtes seront incubées à 30°C /48h. La présence d'une activité sera indiquée par l'apparition d'un halo clair autour des colonies.

3.4.5. Détermination de l'activité protéasique

La présence des protéases est révélée sur un milieu de culture contenant en g/l : caséine pancréatique (5) ; Extrait de levures (2,5) ; Glucose (1), Agar (15). Le milieu est ajusté à pH 7, Parallèlement, 100 ml d'une solution de lait écrémé à 10% autoclavée (120°C/10min) est préparée et ajoutée au milieu. Les boîtesensemencées sont incubées à 30°C/48h. L'apparition d'un halo transparent autour des disques reflète la présence d'une activité hydrolytique (Bach et Munch, 2000).

3.4.6. Détermination de l'activité amylasique

La révélation de l'activité hydrolytique de l'amidon est mise en évidence par un test d'activité sur gélose à base d'amidon contenant en g/l : KNO₃ (0,5) ; K₂HPO₄ (1,0) ; MgSO₄ (0,2) ; CaCl₂ (0,1) ; FeCl₃ (0,001) ; amidon soluble (10) ; agar (15). Le pH a été ajusté à 7,2. Le milieu est ensemencé, puis incubé à 30°C /48 -72 h. Ensuite, une solution de lugol préalablement préparée (1 g d'idoine cristallin, 2 g de KI, 300 ml d'eau distillée), mélangée et laissée au repos puis filtrée, est versée à la surface des boîtes ensemencées, quelques minutes après, l'excès est éliminé et les boîtes sont rincées à l'eau distillée. L'apparition d'une zone claire autour des disques indique la présence d'une activité amylasique (Vinoth et *al.*, 2009).

3.4.7. Détermination de l'activité phosphatasique

La solubilisation du phosphate est effectuée sur milieu Pikovskaya (PVK) contenant en g/l : extrait de levure (0,5) ; glucose (10) ; MgSO₄. 7H₂O (0.1) ; Agar (1,5) ;(NH₄)₂SO₄ (0,5) ; Ca₃(PO₄)₂ (5) ; NaCl (0,2) ; KCl (0,2) ; MnSO₄.2H₂O (0,002) et FeSO₄.7H₂O (0,002), après autoclavage (120°C/20min) du milieu, ensuite, 20 ml d'une solution du phosphate tricalcique (10%) sont rajoutées. L'activité phosphatasique est traduite par l'apparition d'un halo transparent autour des colonies (Sonam et *al.*, 2011).

3.5. Caractérisation phénotypiques des souches sélectionnées

3.5.1. Coloration de Gram, la mobilité et test de catalase

La coloration de Gram, la mobilité bactérienne et test de catalase sont déterminés selon la méthode de Hans Christian Gram (1884), et Prescott (2002) et Galzy (1980), respectivement.

Résultats

Dans cette présente étude, 8 échantillons du sol (A, B, C, D, E, G, K et N) sont prélevés de deux sites, à une profondeur allant de 15 à 20 cm, dans le but d'isoler des bactéries productrices de substances antifongiques, d'enzymes d'intérêt agricole et de phytohormones.

1. Caractères physico-chimiques du sol

Les résultats des tests d'humidité gravimétrique, du pH, de conductivité électrique et de la matière organique totale des échantillons collectés sont regroupés dans le tableau suivant :

Tableau II: Propriétés physico-chimiques des échantillons du sol prélevés.

Echantillons	Humidité gravimétrique « θg »	pH	Conductivité électrique (ds/m ³)	Matière organique totale (%)
A	0,42	7,52	1,72	93
B	0,48	7,75	1,39	93
C	0,37	6,68	1,87	87
D	0,20	8,46	2,88	66
E	0,40	7,58	2,62	92
G	0,19	7,86	3,65	65
K	0,36	8,02	1,30	86
N	0,22	8,11	2,18	68

Nous remarquons une forte variation des taux d'humidité des sols prélevés, les valeurs les plus élevées sont enregistrées avec les échantillons A, B et C qui sont prélevés d'une région près de la mer.

La conductivité électrique des 8 échantillons présente des valeurs comprises entre 1,30 ds/m³ et 3,65 ds/m³, toutes les valeurs sont inférieures à 4 ds/m³, ce qui signifie que les terrains dans lesquels nous avons effectué nos prélèvements ne sont pas affectés par la salinité. Quant à la matière organique totale, il a été noté que le contenu en matière organique des échantillons A et B est le plus élevé 0,93, pour les autres échantillons, les valeurs varient entre 0,65 et 0,92. Concernant le pH, la totalité des échantillons ont un pH alcalin.

2. Criblage d'isolats bactériens producteurs de molécules antifongiques et à caractères PGP

2.1. Isolement et sélection des souches

82 colonies différentes sont isolées à partir des échantillons collectés, et cela sur la base de l'aspect des caractères macroscopiques des colonies sur milieu (PCA) (la taille, la forme, la couleur et la surface).



Fig. 6: Quelques aspects des colonies obtenues après purification sur milieu ou PCA

2.2. Mise en évidence de l'activité antifongique

Les 82 isolats sont testés contre trois souches de champignons phytopathogènes : *Botrytis cinerea*, *Aspergillus niger* et *Penicillium sp* en présence de boîtes témoins. L'inhibition de la croissance mycélienne qui se traduit par l'apparition d'une zone d'inhibition indique un résultat positif (Fig. 7). A la fin de ce test, les résultats obtenus indiquent que 18,29% (15/82) des isolats (A1, A3, A5, A7, E1, E2, E3, E7, E8, E9, E10, E11, E12, K1, N2) ont montré des zones d'inhibition, dont le diamètre de ces dernières diffère selon la souche testée et le champignon cible. La mesure des diamètres des zones d'inhibition a permis de calculer les PGI% (pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne) pour les 3 champignons cibles et pour les 15 isolats.

La figure ci-dessous illustre quelques exemples de résultats positifs obtenus sur gélose d'Extrait de Malt.

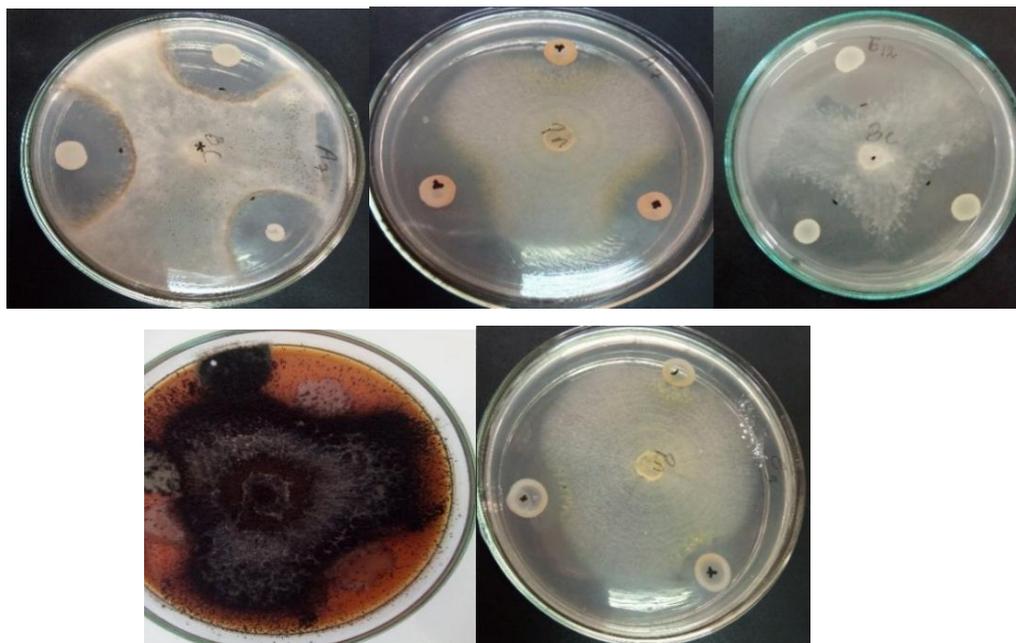


Fig. 7 : Activités antifongiques à l'égard de *B. cinerea*, *A. niger* et *Penicillium sp* des 15 isolats.

Dans le graphe ci-dessous (fig.8) les valeurs des PGI% présentées par les 15 isolats ayant un effet antagoniste à l'égard d'au moins un parmi les trois champignons cibles.

Le faible pourcentage d'inhibition à l'égard de *Botritis cinerea* est obtenu avec l'isolat E9 (27,5%), tandis que la valeur la plus importante est obtenue avec l'isolat N2 avec un pourcentage d'inhibition de 55%. Dans le cas d'*Aspergillus niger*, les valeurs de PGI% minimales et maximales obtenues sont 25,83% et 70% enregistrées par les isolats E12 et E1 respectivement. Pour *Penicillium sp*. L'isolat E12 a marqué le pourcentage d'inhibition le plus faible avec une valeur de 30,83%, tandis que la souche N2 a marqué le pourcentage d'inhibition le plus important, dont ce dernier a atteint 70%. Tous les isolats sélectionnés ont présenté différents pourcentages d'inhibition à l'égard d'au moins un des champignons testés, en effet, deux isolats N2 et E12 qui ont pu inhiber la croissance des trois champignons ciblés avec des taux d'inhibition qui diffèrent selon le champignon cible et l'isolat testé.

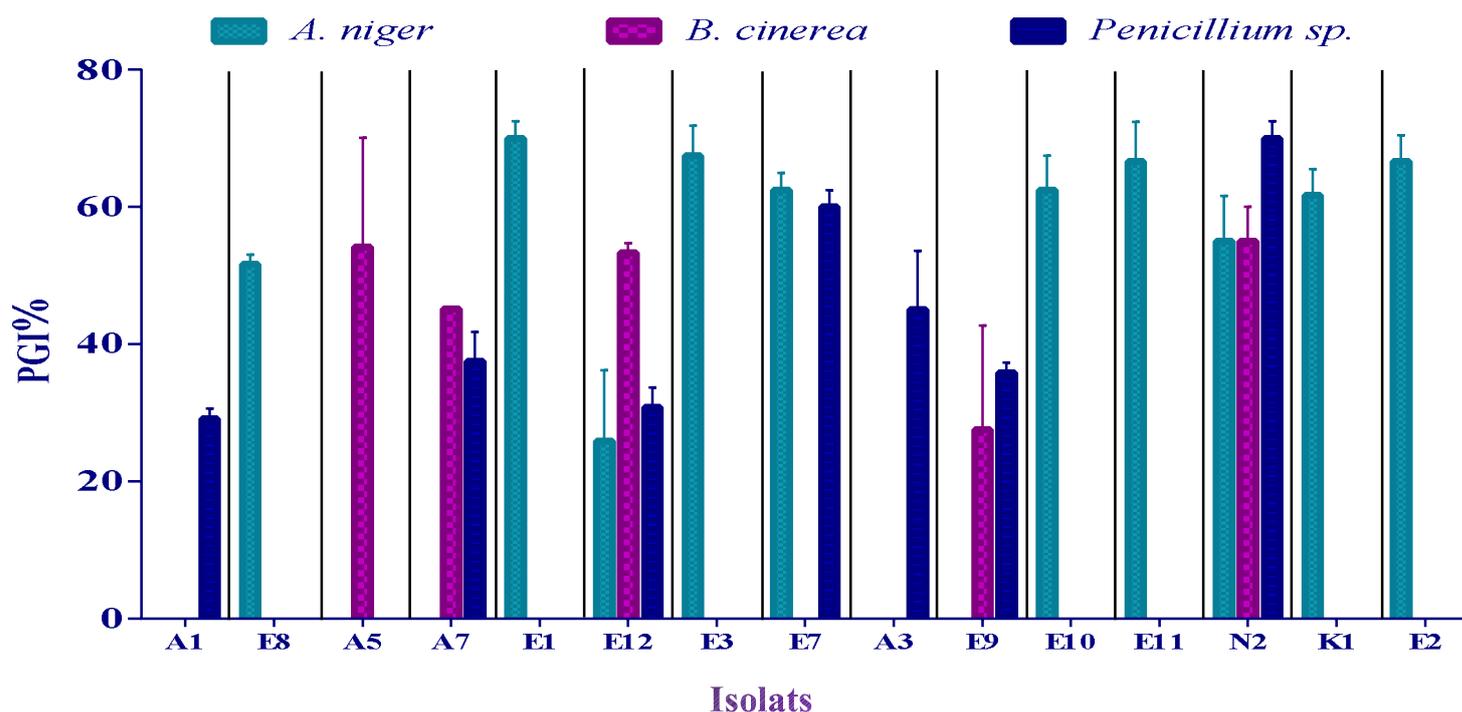


Fig. 8 : Pourcentage d’inhibition de la croissance (PGI%) d’*A. niger*, *B. cinerea* et *P. sp* par les isolats sélectionnés.

2.3. Production d’HCN

Le cyanure d’hydrogène est l’un des produits impliqués dans l’élimination de divers agents phytopathogènes, le virage de la couleur du papier Watman du jaune à l’orange ou marron est un indicateur de la production de l’HCN.

Parmi les 15 isolats testés, seul l’isolat A1 s’est révélé productrice de l’HCN.



Fig. 9 : Aspect de résultat positif (HCN⁺) obtenu pour la souche A1

2.4. Production d'ammoniac

L'aspect du milieu après inoculation, incubation à 30°C et l'ajout du réactif de Nessler, tous les milieux apparaissent de couleur jaunâtre ou orange sauf pour l'isolat **A3**, ce qui confirme la production de NH₃ par les 93,33 % de ces isolats. Le tableau suivant résume les résultats obtenus.

Tableau III : Résultats de la capacité des quinze isolats à produire l'ammoniac (NH₃)

Isolats	Résultats	Aspect
A1	+	
A3	-	
A5	+	
A7	+	
E1	+	
E2	+	
E3	+	
E7	+	
E8	+	
E9	+	
E10	+	
E11	+	
E12	+	
K1	+	
N2	+	

2.5. Production des substances antifongiques volatiles

La culture des bactéries et des champignons sur deux boîtes séparées évite le contact entre la gélose contenant la bactérie et la gélose sur laquelle se trouve le champignon, ce qui empêche la diffusion des substances dans le milieu de culture. Seules les substances volatiles produites par la bactérie pourront donc provoquer une inhibition de la croissance du champignon.

La croissance, l'aspect et la couleur du mycélium sur les boîtes sont différents par rapport au témoin non traité. Dans le cas d'*Aspergillus niger*, le témoin montre la présence d'un mycélium aérien dense avec des spores sur toute la surface de la boîte, tandis que, au contact de l'isolat E12, le champignon présente un mycélium réduit, rond et épais, d'une couleur blanche et absence totale de spores avec le PGI% le plus important (56,43%), le PGI% le plus faible est enregistré avec k1 (10,81%), dans ce cas le champignon présente un mycélium épais sporulé au centre et à la périphérie.

Pour *Botrytis cinerea*, le témoin révèle la présence d'un mycélium aérien abondant gris et dense avec des spores noires, le PGI % le plus élevé est remarqué avec la souche E9 avec un pourcentage de 83,89%, inhibition presque totale de la croissance du champignon (mycélium

faible ou absent), et la souche E12 avec un pourcentage de 51,5% (un mycélium blanc avec absence de spores).

Le PGI% le plus important envers *Penicillium sp* est enregistré avec l'isolat E7 (71,66%) (Un mycélium très réduit sans production des spores par rapport au témoin qui montre un mycélium diffusé et sporulé), par contre, Le PGI% le plus faible est noté chez A3 (11,74%) et A7 (11,9%). Les résultats obtenus à la suite de cette expérience sont illustrés dans les figures ci-dessous :

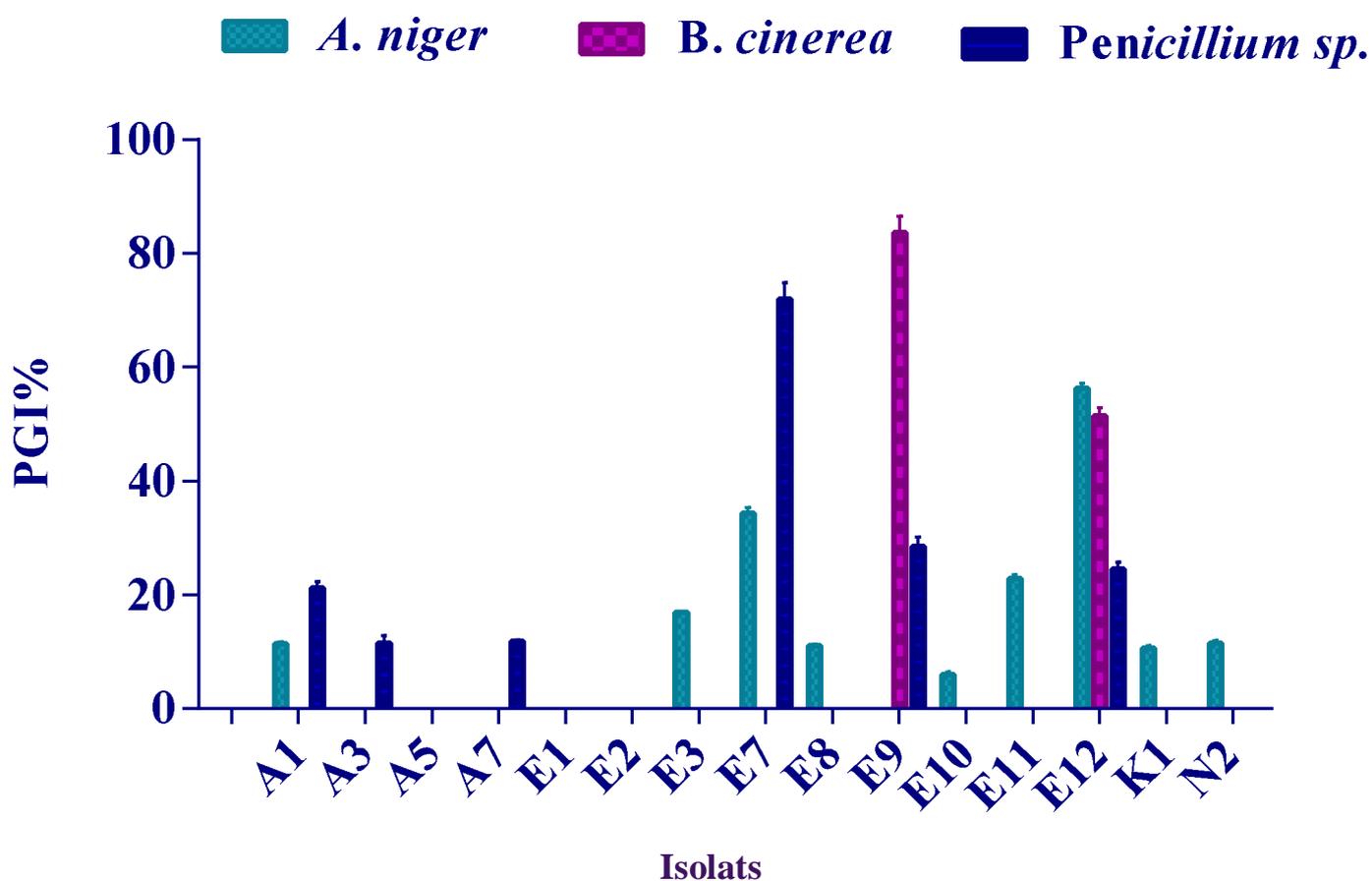


Fig. 10: PGI% d'*A. niger*, *B. cinerea* et *P. sp* sous la production des substances volatiles par les 15 isolats.

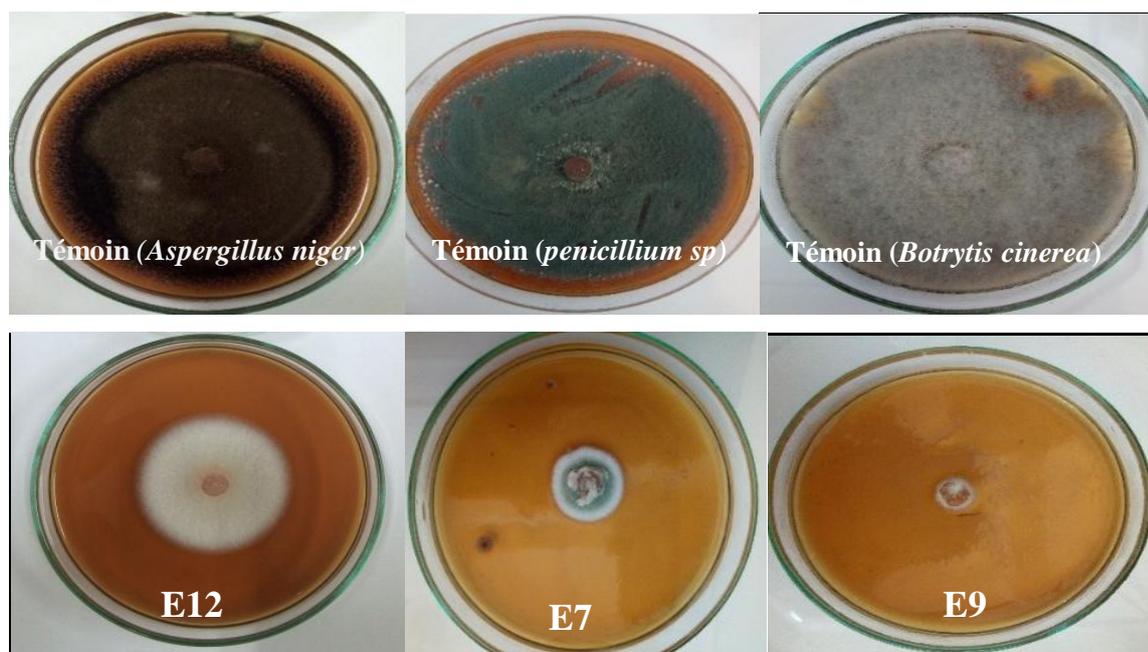


Fig. 11: Aspect de quelques résultats de test de la production des substances volatiles antifongiques

2.6. Production d'acide indole acétique (AIA)

La mise en évidence de la production d'AIA est réalisée sur milieu LB additionné de tryptophane et du glucose. L'apparition de la couleur rose (**Fig. 12**) traduit la production d'AIA par l'isolat. Les valeurs de concentration d'AIA produites par chaque bactérie sont présentées dans la figure 13 :

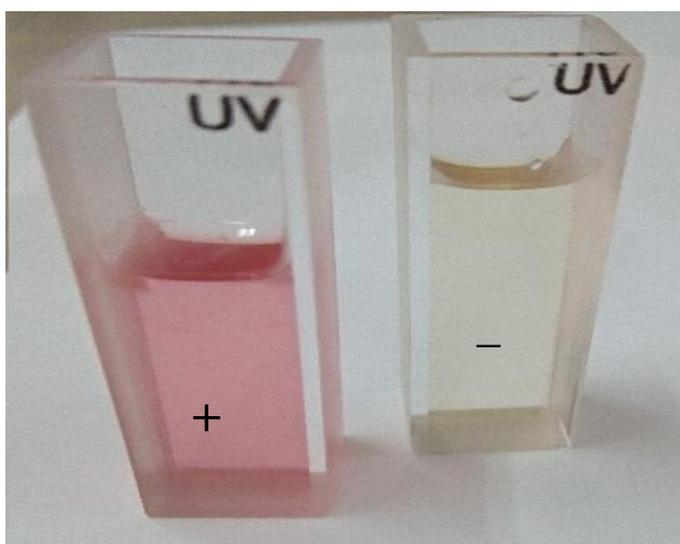


Fig. 12 : Aspect de résultat positif et négatif de la production d'AIA

Les résultats obtenus montrent que tous les isolats ont produit de l'AIA, mais à des quantités variables. A5, E1, E2, E3, E7, N2 ont produit les quantités respectives les plus élevées avec des valeurs en $\mu\text{g/ml}$ de : $(19,16 \pm 8,75)$, $(10,88 \pm 2,09)$, $(15,18 \pm 9,46)$, $(12,40 \pm 4,03)$, $(10,07 \pm 1,53)$, $(11,18 \pm 1,36)$. Cependant, A7 a produit la plus faible concentration parmi les 15 isolats $(1,87 \pm 2,04)$.

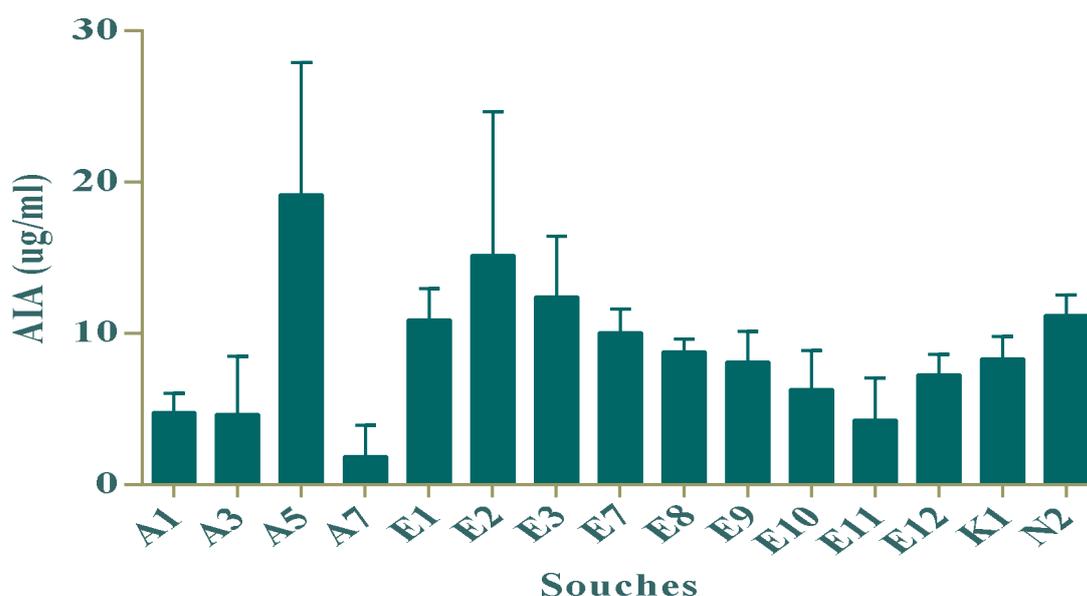


Fig. 13 : Quantité d'AIA produite par les isolats sélectionnés

2.7. Activité enzymatique

Les 15 isolats sélectionnés sont testés pour la production de : cellulases ; chitinases ; estérases ; protéases ; amylases ; lipases ; phosphatases et uréases. Le tableau ci-dessous regroupe l'ensemble des résultats obtenus.

A partir des résultats, on peut bien noter que les isolats ne possèdent pas la même machinerie enzymatique, dont : 20% (3/15) produisent de l'uréase, 13.33% (2/15) produisent de la phosphatase, 66.66% (10/15) produisent de la cellulase, 33.33% (6/15) produisent des estérases, 60% (9/15) produisent des lipases, 80% (12/15) produisent des protéases, 40% (7/15) produisent des amylases et 6% (1/15) produisent de la chitinase.

L'aspect des résultats positifs des activités enzymatiques obtenus sur milieu de culture sont présentés dans la figure 14.

Tableau IV : Résultats des différents tests d'activités enzymatiques testés pour les 15 isolats

Souches	Uréase	Chitinase	Cellulase	Estérase	Lipase	Protéase	Amylase	Phosphatase
A1	-	-	-	+	+	-	-	+++
A3	-	-	-	-	+	-	-	-
A5	-	-	++	++	++	-	-	-
A7	+	-	+++	+	++	+++	++	-
E1	++	-	+	-	++	+++	+	-
E2	++	-	+++	-	-	+++	+	-
E3	-	-	++	-	+	+++	+	-
E7	-	-	+++	+	++	+	+++	-
E8	-	-	+	-	+++	+	++	-
E9	-	-	++	-	-	+	-	++
E10	-	-	-	-	-	+	-	-
E11	-	-	-	-	-	+	-	-
E12	-	-	+	+	-	+	-	-
K1	-	-	++	+	+	++	-	-
N2	-	+++	-	-	-	+++	+	-

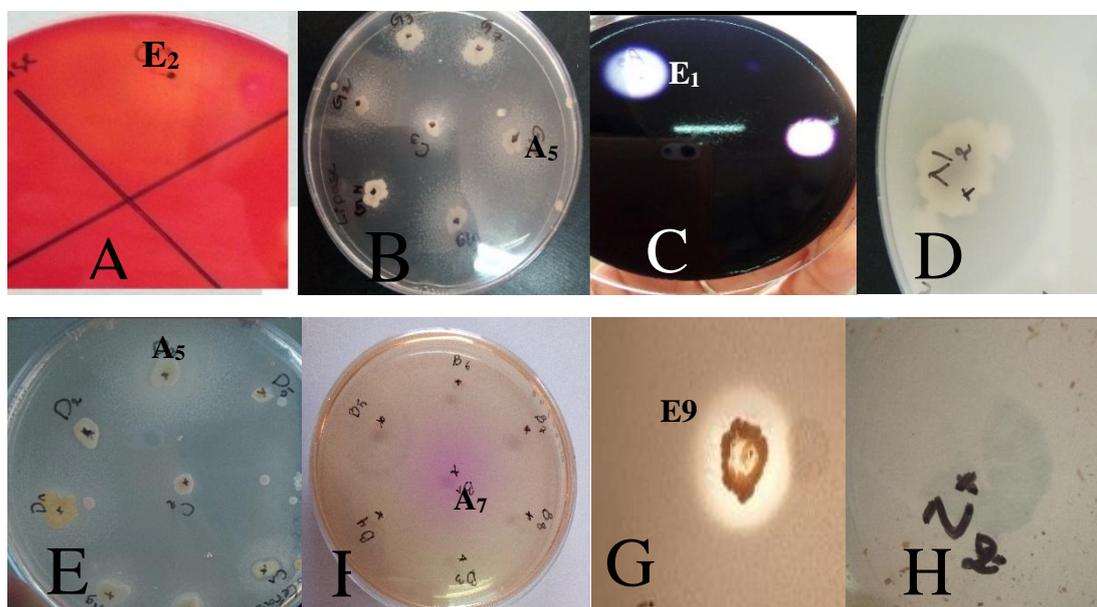


Fig. 14: Aspect des résultats positif des activités enzymatique testées : A-Cellulase, B- Lipase, C- Amylase, D-Protéase, E-Estérase, F-Uréase, G-Phosphatase, H-Chitinase.

3. Les caractères phénotypiques

Les caractères morphologiques (la mobilité et le Gram) et biochimiques (catalase) des 15 isolats montrent les résultats suivants :

Tableau V: les caractères microscopique et biochimique des souches

Isolats	Gram	mobilité	Catalase
A1	G-	+	+
A3	G-	+++	+
A5	G+	++	+
A7	G+	-	+
E1	G+	+++	+
E2	G+	-	+
E3	G+	+	+
E7	G+	++	+
E8	G+	-	+
E9	G+	-	+
E10	G+	-	+
E11	G-	-	+
E12	G+	-	+
K1	G-	-	+
N2	G+	-	+

Il faut signaler que la majorité des isolats 73,33% (11/15) sont des Gram +, alors que 26,66% (4/15) sont des Gram-. Pour la catalase, les résultats révèlent que cette dernière est positive pour tous les isolats (100%).

Discussion

Le présent travail porte sur la recherche, l'isolement et la sélection des isolats bactériens possédant une activité antifongique et à caractères PGP, afin de les utiliser comme agents de lutte biologique vis-à-vis des champignons phytopathogènes. Les 8 échantillons de sols utilisés pour cet objectif ont été prélevés dans deux wilayas d'Algérie (Alger et Bejaia).

Au total, 82 isolats bactériens ont été sélectionnés sur la base de leurs critères phénotypiques sur gélose ordinaire PCA, à savoir ; la forme, la taille, la couleur et l'aspect des colonies obtenues après incubation à 30°C/ 24 à 48h. Pour chaque isolat, une colonie est suspendue puis testée pour la présence d'une activité antifongique. Les résultats de ce test ont permis de sélectionner 18,29% (15/82) des isolats. Ces derniers ont subi d'autres tests, tels que la production de l'HCN, la production de l'AIA et de certaines enzymes.

1. Caractères physico-chimiques du sol

Une forte variation dans la teneur en eau des sols prélevés est remarquable, cette variation est due à la composition du sol et la région dont il se trouve. Tous les échantillons ont une forte teneur en eau, surtout les échantillons (A, B, C) prélevés près de la mer.

La mesure du pH d'un sol reflète la concentration des ions H_3O^+ à l'état dissocié dans le liquide surnageant, selon Denis (2000) les échantillons ; A, C, E ($6,5 < pH < 7,5$) sont des sols neutres. D'après Carrow et *al.*, (2001), les bactéries du sol préfèrent une certaine gamme du pH allant de 6 à 8 pour leur croissance.

La conductivité électrique est considérée comme un indicateur de la salinité, plus un échantillon est salé plus il est conductible. Les sols salins sont caractérisés par une conductivité électrique supérieure à 4 dS/m (Aubert, 1975). Selon ces données, les terrains agricoles d'où sont effectués les prélèvements ne sont pas salins.

La matière organique du sol est composée d'organismes vivants, de résidus de végétaux et d'animaux et de produits en décomposition. La matière organique peut constituer un des indicateurs de la fertilité des sols, elle interagit continuellement avec les autres propriétés physico-chimiques telles que le pH, la salinité et son contenu en eau. Le taux de la matière organique augmente généralement avec l'augmentation de l'humidité d'un sol en raison de la mauvaise aération engendrée par la saturation en eau. D'un autre côté, la salinité élevée et les pH extrêmes réduisent les taux de dégradation de l'humus et, par conséquent, diminuent les apports en matière organique dans le sol (Bot et Benites, 2005).

2. Mise en évidence de l'activité antifongique

Les antagonistes bactériens ont reçu beaucoup d'attention en raison de leur capacité à contrôler les différentes classes d'agents phytopathogènes à travers plusieurs modes d'action,

et la possibilité d'une utilisation combinée avec d'autres méthodes de contrôle (Vitullo et *al.*, 2012). Dans ce présent travail, 18,29% (15/82) des isolats présentent une activité antifongique à l'égard des trois champignons phytopathogènes. La mesure des diamètres des zones d'inhibition a permis de calculer les PGI% (pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne) pour les trois champignons cibles.

Parmi les 15 isolats, 10 (66,66%) ont montré une action importante vis-à-vis d'*Aspergillus niger* avec des PGI% allant de 25,83 à 70% noté pour les isolats E12 et E1 respectueusement, ces résultats sont satisfaisants en comparant à ceux obtenus par Thakur et *al.*, (2007) ayant trouvé un pourcentage de (42.72%) d'isolats anti- *A. niger*. Pour *B. cinerea* les 5/15 (33,33%) isolats (A5, A7, E9, E12 et N2) présentent des taux d'inhibition importants avec des PGI% variant de 27,5 à 55%, dans un travail similaire, Trotel-Aziz et *al.*, (2008) , 34.6% isolats sont dotés d'une activité antifongique contre *Botrytis cinerea*. En ce qui concerne *Penicillium sp.*, 7 isolats (46,66%) exhibent une activité inhibitrice avec des pourcentage variant de 30,83% à 70%.

Tous les résultats précédents sont proches et corroborent avec ceux obtenus par Przemieniecki et *al.* (2015), le pourcentage d'inhibition de la croissance le plus élevé obtenu à l'égard des champignons phytopathogènes par le test en double culture été seulement de 38%. D'après Essghaier et *al.*, (2012), cette inhibition de la croissance des pathogènes *in vitro* et la formation de zones d'inhibition semblent être dues aux métabolites secondaires libérés par les bactéries antagonistes dans le milieu de culture.

Par ailleurs, cette variation du taux d'inhibition des champignons-tests par l'action des souches antagonistes pourrait être liée à la composition des métabolites secondaires secrétés qui varie selon la souche productrice, comme elle pourrait être liée aux conditions de production de métabolites antifongiques. Selon Haggag et Mohamed (2007), l'utilisation de microorganismes antagonistes ou de leurs métabolites actifs comme une alternative écologiquement durable aux produits chimiques constitue une approche non négligeable dans la bio-remédiation. En effet, Islam et Hossain, (2013), stipulent que la compétition entre les bactéries et les phytopathogènes a longtemps été considérée comme un moyen important pour éliminer les maladies des plantes.

3. Production d'HCN

Le cyanure d'hydrogène (HCN) est un composé volatile antimicrobien à large spectre impliqué dans le contrôle biologique des maladies des racines par *Pseudomonas fluorescens* associée aux plantes, il est produit en quantités différentes par différentes espèces de

Pseudomonas, mais aussi par d'autres bactéries (Ramette et al., 2003 ; Weisskopf , 2013). Bien que le cyanure soit un inhibiteur métabolique général, il est synthétisé, excrété et métabolisé par certains organismes dont les bactéries qui l'utilisent comme un moyen d'éviter la prédation ou la compétition. Les plantes hôtes ne sont généralement pas affectées par le cyanure bactérien (Zeller et al., 2007).

Dans ce travail, les résultats obtenus après incubation montrent que seul l'isolat A1 est capable de produire l'HCN. Ceci pourrait être expliqué par l'absence des gènes responsables de la production de ce métabolite (Laville et al., 1998), ou bien de celle d'un précurseur adéquat utilisé, en plus de la glycine comme précurseur (Castric, 1977; Curl et Truelove, 1986) .

La production de l'HCN est une activité très commune chez *Pseudomonas* (88,89%) et *Bacillus* (50%) dans le sol rhizosphérique (Charest et al., 2005; Ahmad et al., 2008)

4. Production d'ammoniac

La production d'ammoniac par les bactéries est l'un des mécanismes impliqués dans la lutte contre les champignons phytopathogènes (Kavithaetal., 2013). Elle est considérée comme une caractéristique importante des rhizobactéries améliorant indirectement la croissance des plantes (Josepheetal., 2007). D'après les résultats obtenus, la production de NH₃ existe chez la majorité de nos isolats (93,33%) à des taux plus au moins intenses selon le virage de la couleur après l'addition du réactif de Nessler (Tableau III). D'après Ahmed et al. (2008), La production d'ammoniac est l'un des traits de promotion indirecte de la croissance des plantes.

5. Production des substances volatiles

Malgré l'absence d'un contact direct entre les champignons et les isolats bactériens, ces derniers ont pu exercer une activité inhibitrice sur le développement mycélien. Plusieurs études ont révélé que de nombreux microorganismes peuvent produire des substances antimicrobiennes volatiles (Wenke et al., 2012). Nos résultats montrent que 80% des isolats présentent un résultat positif et des taux d'inhibition qui varient d'un champignon à un autre. Seule la bactérie E12 manifeste un spectre d'action plus au moins important vis-à-vis des trois champignons.

Les produits volatiles du métabolisme microbien peuvent souvent empêcher la croissance fongique, prévenir les maladies, promouvoir la croissance ou induire une résistance. Ceux-ci constituent une classe importante de ressources de biocontrôle. Les substances antimicrobiennes volatiles ont plusieurs propriétés qui leurs sont spécifiques y compris la

pénétration rapide vers la cible et l'effet à faible dose. Ceci tend à rendre leur effet préventif des maladies plus prononcé ainsi qu'à élargir leur champ d'application (You et *al.*, 2015 ; Howell et *al.*, 1988).

6. Production de l'acide indole acétique « AIA »

Les PGPR peuvent contribuer à l'amélioration du développement des végétaux avec la production de différentes phytohormones, dont l'auxine (Kloepper et *al.*, 2007). Cette hormone représentée principalement par l'acide indole-acétique (AIA) est de nature acide faible commune, mais aussi, un produit du métabolisme du L-tryptophane qui stimule : l'élongation cellulaire et la dominance apicale ; favorise l'initiation des racines adventives ; la fructification et la germination des graines et prévient l'abscission des feuilles (Labidi, 2016). Environ 80% des bactéries rhizosphériques sont capables d'en produire. Le L-tryptophane est considéré comme le précurseur parce que son addition est nécessaire à la production de l'AIA. Les exsudats racinaires sont une source naturelle de L-tryptophane pour la microflore de la rhizosphère (Dastager et *al.*, 2010). La production d'auxines, dans le milieu LB, se traduit par une coloration rose après l'ajout du réactif Salkowski. L'intensité de la couleur varie selon la concentration en AIA produite. Pour ce test, 100% de nos résultats sont positifs avec une production d'AIA en quantités variables.

Les résultats obtenus montrent que 8 isolats A1, A3, E8, E9, E10, E11, E12, K1 ont synthétisé l'AIA à des valeurs allant de 5 à 10 $\mu\text{g/ml}$. Par contre, les souches E1, E2, E3, N2 ont synthétisé des quantités plus élevées atteignant plus de 11 $\mu\text{g/ml}$, cette performance est notée surtout pour l'isolat A5 (19,16 $\mu\text{g/ml}$). Alors que, l'isolat E7 a libéré un taux très faible qui est de 1,7 $\mu\text{g/ml}$.

D'après Khalid et *al.*, (2004), les bactéries produisant l'auxine AIA dans le sol génèrent une augmentation remarquable de la croissance et du rendement des récoltes. Selon Mirza et *al.* (2001), la production de ce composé est variable entre les souches de différentes espèces, cette variation est aussi influencée par les conditions de culture, la phase de croissance et la disponibilité du substrat.

7. Activité enzymatique

La majeure partie de la matière organique dans le sol se trouve sous forme des polymères, ces derniers ne peuvent pas être assimilés directement par les bactéries. Cependant, grâce à l'activité des enzymes extracellulaires bactériennes, ces composés de haut poids moléculaire peuvent être clivés en monomères et petits oligomères appropriés pour être assimilés par la cellule bactérienne (Rath et *al.*, 1993 ; Arnosti et *al.*, 2009). Parmi ces enzymes

produites par les bactéries : les phosphatases, les uréases, les protéases, les cellulases (Przemieniecki et *al.*, 2015). La production d'enzymes dégradant la paroi cellulaire est un autre mécanisme utilisés par les agents de biocontrôle pour éliminer les phytopathogènes (notamment les champignons) (Chet et *al.*, 1990 ; Kobayashi et *al.*, 2002), telle que les chitinases, lipases et protéases sécrétée par des PGPR (Labuschagne et *al.*, 2010).

Nos isolats se sont révélés producteurs d'au moins 3 enzymes (cellulase : 34.7%, amylases : 66,66 %, lipase : 60%, estérase : 40%, protéase : 80% et chitinase : 6,66% ; uréase: 20%, phosphatase : 13,33).

7.1. Activité lipasique et estérasique

Les estérases et les lipases ont été mises en évidence en 1901 chez des bactéries telles que *Bacillus prodigiosus*, *Bacillus pyocyaneus*, *Bacillus fluorescens*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Pseudomonas fluorescens* (Eijkmann, 1901 ; Fickers et *al.*, 2007). L'intérêt des lipases microbiennes n'a cessé d'augmenter au cours des 25 dernières années, principalement en raison du grand nombre d'applications qu'elles offrent dans différents domaines. Les lipases microbiennes présentent comme avantages d'une part, les procédés de fabrication qui sont relativement simples comparés aux lipases d'origine animale, et d'autre part, elles montrent une grande stabilité vis-à-vis de la température, des détergents et des enzymes protéolytiques. (Sharma et *al.*, 2001). Dans ce travail, 60% des isolats exhibent une activité lipolytique et 40% produisent une estérase. Cette activité biologique est surtout liée à leur effet sur les lipides de la membrane cellulaire où ils peuvent favoriser selon la concentration, la formation de pores irréversibles dans la double couche de phospholipides. Ces peptides antifongiques inhibent la croissance d'un grand nombre de champignons y compris *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, les bactéries et les oomycètes (Munimbazi et Bullerman, 1998).

7.2. Activité amylasique

Les amylases sont des enzymes qui hydrolysent l'amidon ou le glycogène, elles peuvent dériver de plusieurs sources comme les plantes, les animaux et les microorganismes. Ces derniers sont plus favorisés grâce à leur large disponibilité et leur production volumineuse à l'échelle industrielle (Vidyalakshmi et *al.*, 2009). Dans cette étude, l'activité amylasique est révélée chez 46,66% des isolats obtenus, la synthèse de ces enzymes par les bactéries du sol permet une dégradation de la matière organique et fournit les éléments nécessaires pour la croissance des plantes. Dans leur étude sur *Bacillus sp*, Obi et Odibo (1984) ont révélé une production de quantités considérables en α -amylases. Selon Whipps (2001), Siddiqui (2005) et Viollet (2010), l'amylase produite par les *Pseudomonas* stimule la croissance et la santé des plantes.

7.3. Activité chitinasique

Les chitinases jouent un rôle protecteur contre les champignons phytopathogènes en raison de leur capacité d'interférer leurs constituants en chitine (Gadelhaka *et al.*, 2005). Cette activité est observée chez l'isolat N₂ sélectionné. Selon Bhushan et Hoondal (1998), les micro-organismes produisant cette enzyme sont classés dans la catégorie des agents de lutte biologique, ces chitinases hydrolysent des polymères linéaires insolubles de $\beta(1,4)$ de N-acétyl-glucosamine qui est un constituant majeur des cellules pariétales de plusieurs champignons, les coquilles des crustacées et l'exosquelette des insectes. Plusieurs espèces du genre *Bacillus* sont connues pour la production de chitinases, c'est le cas de *Bacillus cereus* inhibant la croissance de *Botrytis elliptica* (Pleban *et al.*, 1997 ; Huang *et al.*, 2005).

7.4. Activité uréasique

Une quantité énorme d'urée est constamment libérée dans l'environnement par les activités biologiques. L'uréase est une enzyme extracellulaire représentant 63% de l'activité totale du sol, son rôle réside dans l'hydrolyse de l'urée pour produire le CO₂ et l'ammoniac (NH₃). Elle est utilisée comme indicateur de la qualité du sol, car sa concentration est intrinsèquement liée au taux de la matière organique (Martinez-Salgado *et al.*, 2010). À cause de ce rôle, l'activité de l'uréase dans les sols a suscité beaucoup d'attention depuis qu'elle a été rapportée par Rotini (1935) (Kumar et Varma, 2011). Dans cette étude, l'activité uréasique est recherchée chez les 15 isolats sélectionnés, 20% (3/15) des isolats ont révélé un résultat positif. Selon, Polacco, (1977), les uréases du sol proviennent principalement des plantes et également des micro-organismes qui produisent les deux types d'enzymes (intra- et extra cellulaires) (Mobley et Hausinger, 1989).

7.5. Activité cellulasique

La dégradation de la cellulose joue un rôle clé dans le cycle de carbone (Lee *et al.*, 2007), elle est essentiellement convertie par les microorganismes en dioxyde de carbone dans des conditions aérobies et en méthane en anaérobiose (Eriksson, 1985). Les résultats obtenus montrent que l'activité cellulasique est observée chez 66,66% (10) des isolats. Ce pourcentage pourrait être expliqué par le type de Gram des isolats obtenus, car d'après (Lu *et al.*, 2005), environ 80% des bactéries cellulolytiques isolées jusqu'à présent sont des Gram positives (Schwarz, 2001).

Par conséquent, l'emploi de la cellulase exogène peut être un moyen potentiel pour l'accélération de la décomposition de la matière organique et de l'augmentation de la fertilité du sol (Zhou *et al.*, 2013).

7.6. Activité protéasique

Les protéases sont parmi les enzymes les plus importantes en industrie avec un pourcentage de 30% de la production mondiale (Gul et *al.*, 2008). Les protéases extracellulaires hydrolysent des protéines en mono- ou oligomères, principalement les peptides et les acides aminés. Ces composés organiques de faible poids moléculaire sont les précurseurs immédiats de la synthèse des protéines et rentrent dans beaucoup de voies métaboliques de la cellule (Manandhar et shrestha, 1999). La recherche de cette enzyme dans nos isolats a indiqué que 80% (12/15) de ces derniers présentent une activité protéasique. Il est bien établi que la production des enzymes lytiques telles que les protéases est l'un des mécanismes d'action indirecte appliqué par les PGPRs dans l'élimination des microorganismes nuisibles (Twisha et Desai, 2014). L'activité protéasique peut avoir un effet plus poussé, elle influence indirectement la synthèse des auxines en libérant les acides aminés comme le tryptophane qui est le précurseur de la synthèse de l'acide indole acétique et d'autres substances appariées (Mansour et *al.*, 1994). Elles sont généralement produites par le genre *Bacillus* (Manandhar et shrestha, 1999).

7.7. Solubilisation des phosphates

L'alimentation minérale en phosphate est l'une des principales activités améliorant la croissance des végétaux. Les bactéries solubilisant le phosphate (phosphobactéries) secrètent une sorte d'acides organiques qui agissent sur les phosphates insolubles et les convertissent en une forme soluble, fournissant ainsi du phosphore assimilable à la plante (Ponmurugan et Gopi, 2006). Elles peuvent être considérées comme des biofertilisants car ces bactéries sont capables de libérer une quantité de P supérieure à celle nécessaire à leur métabolisme, ce qui permet aux plantes d'absorber le surplus (Kloepper et *al.*, 1989). Ainsi, dans notre étude, 13,33% (2/15) des isolats sont capables de solubiliser le phosphate inorganique. Plusieurs auteurs ont révélé l'aptitude des bactéries à solubiliser le phosphate. Rivas et *al.* (2004) ont rapporté que *Microbacterium sp.* solubilise le phosphate inorganique. Gull et *al.* (2004) ont aussi rapporté que les espèces du genre *Bacillus* et *Pseudomonas* ont un grand potentiel de solubilisation du phosphate présent dans le sol. Les essais sur champs en Inde ont démontré que l'utilisation des microorganismes solubilisant du phosphate (MSP) peut augmenter les rendements de cultures jusqu'à 70% (Subba Rao, 1982; Wani et Lee, 1992 ; Verma, 1993). La solubilisation du phosphate est un caractère très commun au *Pseudomonas* et certaines *Enterobacteriaceae* (Sulbaran et *al.*, 2008).

Conclusion

Conclusion

L'utilisation des technologies microbiennes dans l'agriculture s'étend très rapidement par l'identification de nouvelles souches bactériennes efficaces dans l'amélioration de la croissance des plantes, les PGPR, (Plant Growth Promoting Rhizobacteria). En général ces micro-organismes rhizosphériques, exercent sur les plantes diverse effets influençant leurs développements en améliorant leurs compétitivités et leurs réponses aux facteurs de stress externes.

Cette étude a visé une sélection de souches selon leurs capacités d'amélioré la croissance végétale: ayant principalement un rôle dans le biocontrôle protégeant ainsi les plantes des champignons phytopathogènes (ex : production de HCN), dans la biofertilisation (production des enzymes lytiques) et un rôle dans la biostimulation (productrices d'AIA).

Isolement de quatre-vingt-deux isolats différent à partir du 8 échantillons du sol à la recherche d'une activité antifongique a permis de sélectionner 15(18,29%) isolats obtenus du sol avec un pourcentage d'activité de 66,66% ; 33,33% et 46,66% respectivement à l'égard de *Aspergillusniger* , *Botritiscinerea* et *Penicillium sp* .

En conclusion, cette étude a indiqué que les isolats sélectionnés pourraient être exploitée comme agent de lutte biologique notamment les deux isolats E12 et N2 car ils produisent des substances antifongiques qui sont à large spectre. Nos isolats, en plus de leur rôle dans le biocontrôle, peuvent stimuler et améliorer la croissance des plantes en jouant le rôle de biostimulateurs et de biofertiliseurs.

Notre travail reste préliminaire est mérite d'être complété par :

- Tester l'activité de nos isolats sur d'autres champignons et bactéries (genre et espèces) ;
- Réalisation des tests d'inoculation in vivo (sur plantes), au laboratoire et sur champs pour voir leurs caractères de promotion de la croissance des plantes (direct et indirect);
- Identification phylogénétique des isolats;
- Purification, identification et caractérisation biochimique des molécules antifongiques produite.

*Références
Bibliographique*

A

- Abnatura RD. (2013).** Les Rhizobactéries PGPR. Bulletin Technique. Avril 2013 Issue. <http://www.abnatura.com/ESW/Files/abnatura_bulletin. (Accessed 21.04.18).
- Agrios, G.N. (2005).** *Plant Pathology*. (5th Ed). Elsevier Academic Press, ISBN: 13: 978-0120445653, San Diego, CA.
- Ahmad F, Ahmad I, et Khan M.S. (2008).** Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. *Microbiological Research*. 163, 173-181.
- Ahmad, M. & Kibret, M. (2013).** Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: current perspective. *J King Saud Univer-Scien* 26(01): 1-20.
- Ahmed, O.H., H. Aminuddin et M.H.A. Husni .(2008).** Ammonia volatilization and ammonium accumulation from urea mixed with zeolite and triple superphosphate. *Acta Agric. Scand.*, 58: 182-186.
- Ajouz S (2009).** Estimation du potentiel de résistance de *Botrytis cinerea* à des biofongicides. Thèse de Doctorat. Univ d'Avignon et des pays de Vaucluse. France.
- Alexopoulos CJ, Mims CW, Blackwell M (1996).** *Introductory mycology*, 4th edn. Wiley, New York.
- Antoun H. and Prévost D. (2005).** Ecology of plant growth promoting rhizobacteria. Z. A. Siddiqui (ed.), *PGPR: Biocontrol and Biofertilization*. p 1–38.
- Arnosti, C., K. Ziervogel, L. Ocampo and S. Ghobrial. (2009).** Enzyme activities in the water column and in shallow permeable sediments from the northeastern Gulf of Mexico. *Estuarine, Co and Sh Science* 84: 202–208.
- Arora NK, Tewari S, Singh S, Lal N, Maheshwari DK .(2012).** PGPR for protection of plant health under saline conditions. In: Maheshwari DK (ed.) *Bacteria in agrobiology: Stress management*, pp.239-258.

Ashraf, M., Ahmad, M. S. A., Öztürk, M., et Aksoy, A. (2012). Crop improvement through different means: challenges and prospects *Crop Production for Agricultural Improvement* (pp. 1-15): Springer.

Aubert G., (1975). Les sols sodiques en Afrique du Nord An. de l'Institut Nat. Agro. d'Alger v.1, PP. 185- 195

B

Baatour, O., S. M'rah, N. Ben Brahim, F. Boulesnem et M. Lachaal. (2004). Réponse physiologique de la gesse (*Lathyrus sativus*) à la salinité du milieu. *Revue des régions arides*, tome 1, N° Spécial : 346-358.

Babalola, O.O. (2010). Beneficial bacteria of agricultural importance. *Biotechnol Lett* 32:1559–1570.

Baca B.E. et Elmerich C. (2007). Microbial Production of Plant Hormones. In: Elmerich C., Newton W.E. (Eds). *Associative and Endophytic Nitrogen-fixing Bacteria and Cyanobacterial Associations*, Springer, Netherlands. pp. 113-143.

Bach HJ et Munch JC. (2000) .Identification of bacterial sources of soil peptidases. *Biol Fertil Soils*.31,219-224.

Barakat M. Radwan, Mohammad I. Al-Masri, (2017) Effect of *Trichoderma harzianum* in Combination with Fungicides in Controlling Gray Mould Disease (*Botrytis cinerea*) of Strawberry.

Barles, S., Breyse, D., Guillerme, A. & Laeyval, C.. (1999). *Le Sol Urbain*. Collection VILLES, Economica, Paris. 278p.

Barraquio, W. L., E. M. Segurbre, M. S. Gonzalez, S. C. Verma, E. K. James, J. K. Ladha, and A. K. tripathi. (2000). p. 93-118. In the Quest for nitrogen fixation in rice, (ed.), IRRI, Los Banos, Philippines.

Belabid L., Baum M., Fortas Z., Bouznad Z. and Imad-Eujayl I. (2004). Pathogenic and genetic characterization of Algerian isolate of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lentis* by RAPD and AFLP analysis. *Afr. J. Biotechnol.* 3(1), 25-31.

Bhattacharyya PN, Jha DK .(2012). Plant growth-promoting rhizobacteria(PGPR): emergence in agriculture. *World J Microbiol Biotechnol* 28: 1327-1350.

Bhushan B. and Hoondal G.S. (1998). Isolation, purification and properties of a thermostable chitinase from an alkalophilic *Bacillus sp. BG-11*. *Biotechnology Letters*, **20**:(2). 157–159.

Bot, A., & Benites, J. (2005). *The importance of soil organic matter: Key to drought-resistant soil and sustained food production* (No. 80). Food & Agriculture Org.

Botelho, G. R. and Mendonça-Hagler, L. C., (2006). Fluorescent Pseudomonads associated with the rhizosphere of crops - an overview. *Braz. J. Microbiol.* **37**: (4):401- 416.

Briat, J.F. (1992). Iron assimilation and storage in prokaryotes. *J. Gen. Microbiol.*, 138:2475-2483.

Bric J.M., Bostock R.M., Silverstone S.E. (1991). Rapid in situ assay for indol acetic acid production by bacteria immobilization on a nitrocellulose membrane. *Appl Environ. Microbiol.* 57: 535-538.

Buchmuller-Rouiller, Y., S. B. Corradin, J. Smith, and J. Mauel. (1994). Effect of increasing intravesicular pH on nitrate production and leishmanicidal activity of activated macrophages. *Biochem. J.* **301**:243–247.

C

Carrow R.N., Wassington D.V. and Rieke P.E. (2001). Turfgrass soil fertility and chemical problems: Assessment and management. John Wiley & Sons, Inc. pp.273.

Carrim A.J.I., Barbosa E.C. et Gonçalves V.J.D. (2006). Enzymatic Activity of Endophytic Bacterial Isolates of *Jacaranda decurrens* Cham. (Carobinha-do-campo). *Braz Arch Biol Techn.* 49 :353-359.

Castric, PA. (1977). Glycine Metabolism by *Pseudomonas aeruginosa*: Hydrogen Cyanide Biosynthesis. *J. Bacteriol.* 130 : 826-831.

Capuccino J.C. et Sherman N. (1992). Negative staining. *In*: Capuccino J.C. et Sherman N. (Eds), *Microbiology: A laboratory Manual*. Redwood City, CA: Benjamin/Cummings. pp. 125-179.

Charest, M.H., C.J. Beauchamp et H. Antoun .(2005). Effects of the humic substances of deinking paper sludge on the antagonism between two compost bacteria and *Pythium ultimum*. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 52: 219–227.

Chet I., Ordentlich A., Shapira R., Oppenheim A. (1990). Mechanisms of biocontrol of soilborne plant pathogens by rhizobacteria. *Plant Soil*. 129: 85-92.

Christensen W.B. (1946). Urea Decomposition as a Means of Differentiating *Proteus* and *Paracolon* Cultures from Each Other and from *Salmonella* and *Shigella* Types. *J Bacteriol.* 52:461-466.

Compant Stéphane,¹ Brion Duffy,² Jerzy Nowak,³ Christophe Clément,¹ and Essai'd Ait Barka^{1*}, (2015)Use of Plant Growth-Promoting Bacteria for Biocontrol of Plant Diseases: Principles, Mechanisms of Action, and Future Prospects.

Cook, R.J., and Barker, K.F. (1984). The nature and practice of biological control of plant pathogens, APS Press, St. Paul, MN, p. 539.

Corbaz R. (1990). Principe de phytopathologie et de lutte contre les maladies des plantes. *Presse polytechniques et universitaires romandes*.

Curl, E. A. et B. Truelove (1986). The rhizosphere, pp: 55-92. Springer Verlag, Berlin.

D

Dastager, S.G., C.K. Deepa et A. Pandey. (2010) .Potential plant growth promoting activity of *Serratia nematophila* NII-0.928 on black papper (*Piper nigrum* L.). *World J.Microbiol. Biotechnol.*, 27: 259-265.

Davet P . (1996).Vie microbienne du sol et production végétale.Edition INRA ,pp 19-94-95.

De Salamon I.G., Hynes R.K. and Nelson L.M. (2005). Role of Cytokinins in plant growth promotion by rhizosphère bacteria. P. 173-195. In Siddiqui A. A. (ed.), PGPR: Biocontrol and Biofertilization.

De, T. K., Sarkar, T. K. De, M. Maity, T.K. Mukherjee, and S. Das. (2011). Abundance and occurrence of phosphate solubilizing bacteria and phosphatase in Sediment of Hooghly estuary, north east coast of Bay of Bengal, India. *Journal of Coastal Development*. 15: 9-16.

Denis B. (2000). Guide des analyses en pédologie, 2eme édition. 266P.

Dennis, C., Webster, J., (1971). Antagonistic properties of species groups of Trichoderma, II. Production of volatile antibiotics. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 57, 363–369.

Dilip K. Arora (2003) Fungal Biotechnology in Agricultural, Food, and Environmental Applications, CRC Press, 700 p. (ISBN 9780824758790), Preface.

Dommergues Y. and Mangenot F. (1970). *Écologie Microbienne du sol*. Masson, Paris.

E

Eijkmann C. (1901). Über Enzyme bei Bakterien und Schimmelpilzen. *Zentralbl. Bakt. Parasitenkd. Infektionskr*, 29: 841-848.

Elad Y, Kapat A (1999). The role of Trichoderma harzianum protease in the biocontrol of Botrytis cinerea. *European Journal of Plant Pathology* 105(2): 177-189.

Essghaier B., Hedi1 A., HajlaouiM. R., Boudabous A. and Sadfi-Zouaoui. N. (2012). In vivo and in vitro evaluation of antifungal activities from a halotolerant Bacillus subtilis strain J9. *Afr. J. Microbiolog. Res*, 6 19: 4073-4083.

F

Fickers .P ; J. Destainand P Thonart. (2008). Les lipases sont des hydrolases atypiques : principales caractéristiques et applications. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 12: 119-130.

G

Gadelhaki, G. G., K. A. EL-TARABILY, AND F. K. AL-KAABI. (2005). Insect Control Using Chitinolytic Soil Actinomycetes as Bio-control Agents. *International Journal of Agriculture and Biology*. 4: 627–633.

Glick BR. (2012). Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. Hindawi Publishing Corporation, Scientifica, Waterloo.

Glick B. R., C. L. Patten, G. Holguin, et D. M. (1999). Penrose, Biochemical and Genetic Mechanisms Used by Plant Growth Promoting Bacteria, Imperial College Press, London, UK.

Glick B.R., Pasternak, J.J. (1998) Principles and applications of recombinant DNA. ASM, Washington DC 683.

Guiraud J. P. and Galzy P. (1980). L'analyse microbiologique dans les industries alimentaires. Edi Usine. Paris. 239p.

Gul, S., M.U. Rahman, A.K.Khan Achakzai and K.Khan. (2008). Production of extracellular protease by locally isolated *Bacillus subtilis* IC-5 using agriculture by-products. *J.Chem.Soc.Pak.* 30.

Gull I., Hafeez F.Y., Saleem M. et Malik K.A. (2004). Phosphorus uptake and growth promotion of chickpea by co-inoculation of mineral phosphate solubilizing bacteria and a mixed rhizobial culture. *Aust. J. Exp. Agric.* 44, 623-628.

Gupta G, Singh Parihar S, Kumar Ahirwar N, Kumar Snehi S et Singh V. (2015). Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR): Current and Future Prospects for Development of Sustainable Agriculture. *J Microb Biochem Technol.* Volume 7(2), 96-102.

Guzmán M.N., Vargas V.A., Antezana H. and Svoboda M. (2008). Lipolytic enzyme production by halophilic/halotolerant microorganisms isolated from laguna verde, bolivia. Centro de Biotecnología – UMSS, Cochabamba - Bolivia; Laboratoire de Chimie Biologique – Université Libre de Bruxelles, Belgium. **25**(1).

H

Haggag, W.M., Mohamed, H.A.-L.A., (2007). Biotechnological aspects of microorganisms used in plant biological control. *Am.-Eurasian J. Sustain. Agric.* 1: 7– 12.

Hamdy, A., (1999). Saline irrigation assessment for a sustainable use saline irrigation. *Halophyte Production and Utilization, Project No. IC 18CT 96-0055*, pp: 152-226.

Han J, Sun L, Dong X, Cai Z, Sun X, Yang H, Wang Y, Song W. (2005). Characterization of a novel plant growth-promoting bacteria strain *Delftia tsuruhatensis* HR4 both as a diazotroph and a potential biocontrol agent against various plant pathogens. *Syst Appl Microbiol* 28(1):66–76.

Hardie, M., & Doyle, R. (2012). Measuring soil salinity. In *Plant Salt Tolerance* (pp. 415-425). Humana Press, Totowa, NJ.

Hartono, H., Nurfitriani, Fais, A., Harniyati, C., Nur, I.H. & Muhammad, J. (2016). Ability of ammonium excretion, indol acetic acid production, and phosphate solubilization of nitrogenfixing bacteria isolated from crop rhizosphere and their effect on plant growth. *ARPJN Journal of Engineering and Applied Sciences* 11(19): 11735-11741.

Helluy, S., & Holmes, J.C. (2005). Parasitic manipulation: further considerations. *Behavioural processes*, 68(3), 205-210.

Hopkins WG. (2003). physiologie végétale. Traduction de la 2^e édition américaine par SERGE R. Ed de Boeck. pp. 309-362.

Huang X.D., El-Alawai Y., Gurska J., Glick B.R. et Greenberg B.M. (2005). A multiprocess phytoremediation system for decontamination of persistent total petroleum hydrocarbons (TPHs) from soils. *Microchem J.* 81: 139-147.

Huang, D. W., Sherman, B. T., Zheng, X., Yang, J., Imamichi, T., Stephens, R., & Lempicki, R. A. (2009). Extracting biological meaning from large gene lists with DAVID. *Current protocols in bioinformatics*, 13-11.

I

Islam M.T et Hossain M.M. (2013). Biological Control of Perono sporomycete Phytopathogen by Bacterial Antagonist. Maheshwari D.K. (eds.), *Bacteria in Agrobiolgy: Disease Management*, pp. 176-218.

J

Jan A.T. , Azam M. , Ali A. et Rizwanul-Haq Q.M . (2011). Novel approaches of beneficial *Pseudomonas* in mitigation of plant diseases – an appraisal. *J Plant Int.* 6: 195-205.

Jeon J.S., Lee S-S., Kim H-Y., Ahn T-S. and Song H-G. (2003). Plant Growth Promotion in Soil by Some Inoculated Microorganisms. *J. Microbiol.*, 41 4: 271-276.

Jijakli. (2003). lutte biologique in phytopathologie in phytopathologie. Lepoivre P .ed De boeck et larvier s.a.289-317.

Joseph, B., RR. Patra et R. Lawrence. (2007). Characterization of plant growth promoting rhizobacteria associated with chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Int. J. Plant Prod.*, 2: 141-152.

K

Kavitha T., Nelson R. et Jesi S.J. (2013). Screening of rhizobacteria for plant growth promoting traits and antifungal activity against charcoal rot pathogen *Macrophomina phaseolina*, *Int. J. Pharm. Bio Sci.* 4: 177-186.

Khalid, A., M.Arshad. et Z.A. Zahir .(2004). Screening plant growth-promoting rhizobacteria for improving growth and yield of wheat. *J. Appl. Microbiol.*, 96: 473-480(8).

Kloepper J.W. (1993).Plant growth-promoting rhizobacteria as biological control agents in Soil microbial ecology-applications in agricultural and environmental management. Metting, F.B. Jr. (ed.). Merceel Dekker, New York,pp 255-27.

Kloepper JW, Gutierrez-Estrada A, McInroy JA. (2007). Photoperiodregulates elicitation of growth promotion but not inducedresistance by plant growth-promoting rhizobacteria. *Can J Microbiol* 53(2):159–167.

Kloepper J.W., Lifshitz R. and Zablotowicz R.M. (1989). Free living bacterial inocula for enhancing crop productivity. *Trends in Biotechnol*, 7: 39-43.

Kloepper, J. W., R. Rodriguez-Ubana, G. W. Zehnder, J. F. Murphy, E. Sikora, and C. Fernandez. (1999). Plant root-bacterial interactions in biological control of soilborne diseases and potential extension to systemic and foliar diseases. *Austral. Plant Pathol.* 28:21–26.

Kobayashi D.Y., Reedy R.M., Bick J.A., Oudemans P.V. (2002). Characterization of a chitinase gene from *Stenotrophomonas maltophilia* strain 34S1 and its involvement in biological control. *Appl Environ Microbiol.* 68:1047–1054.

Kopečný J., Hodrová B. et Stewart C.S. (1996). The isolation and characterization of a rumen chitinolytic bacterium. *Lett. Appl. Microbiol.* 23:195-198.

Kumar D.S. et Varma A. (2011). Role of Enzymes in Maintaining Soil Health In: Shukla G. et Varma A. (Eds.), *Soil Enzymology*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg. p. 25-42.

L

Labidi, A. (2016). Les auxines et leurs effets sur les végétaux. *Agrimaroc*. [En ligne]. <http://www.agrimaroc.ma/les-auxines-et-leurs-effets-sur-les-vegetaux/> [Consulté le : 15-05-2018].

Labuschagne N., Pretorius T. et Idris A.H. (2010). Plant Growth Promoting Rhizobacteria as Biocontrol Agents Against Soil-Borne Plant Diseases. In: Maheshwari D.K. (ed.), *Plant Growth and Health Promoting Bacteria*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp. 211-230.

Laville, J., C. Blumer, C. Von Schroetter, V. Gaia, G. Delfago, C. Keel et D. Haas. (1998). Characterization of the hcnABC gene cluster encoding hydrogen cyanide synthase and anaerobic regulation by ANR in the strictly aerobic biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *J. Bacteriol.*, 180 : 3187- 3196.

Lee, Y., Kim B., Lee B., Jo K., Lee N., Chung C. and Lee J. (2007). Purification and characterization of cellulase produced by *Bacillus amyoliquefaciens* DL-3, utilizing rice hull *Bioresour Technol*, 98(2): 288-297.

Leroux Pierre, (2007) Chemical Control of Botrytis and its Resistance to Chemical Fungicides.

Lepoivre, P. (2003). Phytopathologie: bases moléculaires et biologiques des pathosystèmes et fondements des stratégies de lutte. De Boeck Université, Bruxelles, Belgium, p. 432.

Lorck H. (1948). Production of hydrocyanic acid by bacteria. *Physiol. Plant.* 1: 142-146.

Lu W.J., Wang H.T., Yang S.J., Wang Z.C. et Yong F.N. (2005). Isolation and characterization of mesophilic cellulose-degrading bacteria from flower stalks-vegetable waste co-composting system. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 51:353–360.

Lugtenberg B., Kamilova F. (2009). Plant-growth-promoting rhizobacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 63: 541-556.

Lynch. J. M. (1990). The potential for gene exchange between rhizosphere bacteria. *J. C. Fry et al. (ed). Bacteria genetics in natural environments.* 172p.

M

Manandhar, S.P. and A. Shrestha. (1999). Protease activity of mesophilic bacteria isolated from leather factory and slaughter house. *Tribhuvan university journal.* XXII: 24-34.

Mansour F. A., Aldesuquy H.S. and Hamedo H.A. (1994). Studies on Plant Growth Regulators and Enzymes Production by Some Bacteria. *Qatar Univ.Sci. J.* 14 (2): 281-288.

Martinez-Salgado M.M., Gutiérrez-Romero V., Janssens M. et Ortega-Blu R. (2010). Biological soil quality indicators: a review. In: Mendez-Vilas A. (Ed.), *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology.* Formatex, Spain. p. 319-328.

Martínez-Viveros I, O., M.A. Jorquera, D.E. Crowley, G. Gajardo and M.L. Mora. (2010). Mechanisms and practical considerations Involved in plant growth promotion by rhizobacteria. *J. Soil Sci. Plant Nutr.* 10: 293 – 319.

Mirza, M.S., Ahmad, W., Latif, F., Haurat, J., Bally, R., Normand, P., & Malik, K. A. (2001). Isolation, partial characterization, and the effect of plant growth-promoting bacteria (PGPB) on micro-propagated sugarcane in vitro. *Plant and Soil*, 237(1): 47-54.

Mobley H.L.T. et Hausinger R.P. (1989). Microbial urease: significance, regulation and molecular characterization. *Microbiol Rev.* 53:85-108.

Moëgne-Loccoz Yvan, Hans-volker Tichy, Anne O'Donnell, Reinhard simon, and Fergal O'Gara, (2001)Impact of 2,4-Diacetylphloroglucinol-Producing Biocontrol Strain *Pseudomonas fluorescens* F113 on Intraspecific Diversity of Resident Culturable Fluorescent Pseudomonads Associated with the Roots of Field-Grown Sugar Beet Seedlings.

Morgan J. A. W., Bending G. D. and White P. J. (2005). Biological costs and benefits to plant–microbe interactions in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany.* **56** : 1729-1739.

Mouden N., Benkiran R., Ouazzanitouhami A., Badoc A. et Douira A. (2010). Effet de six fongicides sur le développement de six souches de *Botrytis cinerea* isolées de fraises.

Munimbazi, C. et LB. Bullerman (1998). Isolation and partial characterization of antifungal metabolites of *Bacillus pumilus*. *J. Appl. Microbiol.* 84:959-969.

Mouria B., Ouazani-Touhami A., Mouria A et Douira A (2013). Mise en évidence d'une variation intra spécifique chez *Botrytis cinerea* et lutte biologique in vitro par l'extrait de compost.*J.Appl.Biosci.*64:4797-4812.

N

Nadeem SM, Naveed M, Zahir ZA, Asghar HN.(2013).Plant-Microbe Interactionsfor Sustainable Agriculture: Fundamentals and Recent Advances. In: Arora NK (ed.) *Plant Microbe Symbiosis: Fundamentals and Advances.* Springer, India,pp. 51-103.

Nannipieri P., Giagnoni L., Landi L., Renella G. (2011). Role of phosphatase enzymes in soil. In: Bunemann EK, Obreson A, Frossard E (eds) *Phosphorus in action.* Springer, Berlin, pp 215–243.

Nasraoui , B. (2006). Les champignons parasites des plantes cultivées, biologie, systématique, pathologie, maladies. *Centre de publication universitaire*,Tunis. P456

Nicot, P.C., and Baille, A. (1996). Integrated control of *Botrytis cinerea* on greenhouse tomatoes, p. 169-189, in: Aerial plant surface microbiology. C. E. Morris, P. C. Nicot and C. Nguyen-The, eds. Plenum Press, New York, USA.

Noumava P.A., Agbodjato N.A., Baba-Moussa F.B., Adjanooum A. and Baba- Moussa L. (2016). Plant Growth Promoting Rhizobacteria: Beneficial effects for healthy and sustainable agriculture. *Afr. J. Biotechnol.* 15 27: 1452-1463.

O

Obi S. K. C. and Odibo F. J. C. (1984). Partial Purification and Characterization of a Thermostable Actinomycete 3-Amylase. *Applied and Environmental Microbiology.* 47: 571-575.

Ongena, M., A. Giger, P. Jacques, J. Dommès et P. Thonart (2002). Study of bacterial determinants involved in the induction of systemic resistance in bean by *Pseudomonas putida* BTP1. *Euro. J. Plant Pathol.*, 108: 187-196.

P

Pandey, A., P. Nigam, C.R. Soccol, V.T. Soccol, D. Singh, and R. Mohan. (2000). Advances in microbial amylases, *Biotechnol. Appl. Biochem.* 31:135–152.

Patel, A. K., V. K. Singh , R. P. Yadav , J.G. Moir and M. V. Jagannadhama. (2010). Purification and characterization of a new chitinase from latex of *Ipomoea carnea*. *Process.*

Patten CL, Glick BR (2002) Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system. *Appl Environ Microbiol* 68:3795–3801.

Pepper I.L. and C.P. Gerba, (2004) *Environmental Microbiology. A Laboratory Manual* SECOND EDITION: 2004 *Photography and Technical Editor: K.L. Josephson Copy Editor: E.R. Loya.*

- Petit J et Jobin P. (2005).** La fertilisation organique des cultures *les bases*. Fédération d'agriculture biologique du Québec. Bibliothèque national de Canada, 48p.
- Piyanoot Jaihan1 · Kusavadee Sangdee et Aphidech Sangdee. (2018)** Disease suppressive activity of extracts from entomopathogenic fungus *Ophiocordyceps sobolifera* against chili anthracnose fungi *Colletotrichum* spp. In a pot experiment.
- Pleban S., Chernin L. and Chet I. (1997).** Chitinolytic activity of an endophytes ctraîne of *Bacillus cereus*. *Letters in Applied microbiology*.**25**: 284-288.
- Podile AR et Kishore KG. (2006).** Plant growth promoting rhizobacteria. In: Gnanamanickam SS (Ed.). *Plant-Associated Bacteria*, Springer, Dordrecht, pp. 195–230.
- Polacco J.C. (1977).** Is nickel a universal component of plant ureases? *Plant Sci Lett.* 10: 249- 255. *Biochemistry* 45: 675–681.
- Ponmurugan P. and Gopi C. (2006).** In vitro production of growth regulators and phosphatase activity by phosphate solubilizing bacteria. *Afr. J. Biotechnol*, 54: 348– 350.
- Prescott L, Harley J. and Klein D. A. (1999).** *Microbiology*. Boston:MC-Graw-Hill. 962p.
- Prescott MI, Harle JD, Klein DA. (2002).** *Microbiology of Food*. 5th ed.McGraw-Hill Ltd, New York, USA. pp. 964-976.
- Przemieniecki1 S.W., Kurowski1 T.P. and Karwowska A. (2015).** Plant growth promoting potential of pseudomonas sp. Sp0113 isolated from potable Water from a Closed Water Well. *Arch. Biol. Sci. Belgrade*, 6 72: 663-673.
- Pujic, P., Normand, P. (2009)** La symbiose racinaire entre la bactérie Frankia et les plantes actinorhiziennes. *Biofuture*, 26-29.

R

Raj.S. V., A. K. Raja, A. B. Vimalanathan, M. G. Tyagi, N. H. Shah, N.A. Johnson Amala Justin, B. I. Santhose, K. Sathiyaseelan. (2009). Study of starch degrading bacteria from kitchen waste soil in the production of Amylase by using paddy straw. *Recent Research in Science and Technology*, 1(1): 008–013.

Ramette A., Frapolli M., Le Saux M.F., Gruffaz C., Meyer J.M., Défago G. Sutra L. and Moëgne-Loccoz.Y. (2011). *Pseudomonas protegens* sp . nov., widespread plant producing the biocontrol compounds 2, 4- diacetylphloroglucinol and pyoluteorin. *Syst. Appl.Microbiol*, 34:180-188.

Rath. O., C. Schiller, G. J. Herndl. (1993). Ectoenzymatic activity and bacterial dynamics along a trophic gradient in the Caribbean Sea. *MARINE ECOLOGY PROGRESS SERIES*.102: 89-96.

Ratul, S., Nabaneeta, S., Donofrio, R.S and Bestervelt, L. (2012). Microbial sidérophores. *Journal of Basic microbiology*.52:1-15.

Rivas R. , Trujillo M.E., Sanchez M., Mateos P.F., Molina E.M. et Velazquez E. (2004) . *Microbacterium ulmi* sp. nov., a xylanolytic, phosphate-solubilizing bacterium isolated from sawdust of *Ulmus nigra*. *Int J Syst Evol Micob*. 54: 513–517.

S

Saddiki S. (1999). Utilisation du *Bradyrhizobium japonicum* comme rhizobactéries favorisant la croissance des plantes chez le maïs. Thèse pour l'obtention du grade de maitre en Science. Université LAVAL, 65p.

Saleem M, Arshad M, Hussain S, Bhatti AS. (2007). Perspective of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) containing ACC deaminase in stress agriculture. *J Ind MicrobiolBiotechnol* 34(10):635–64.

Schippers, B., AW. Bakker et PAHM. Bakker. (1987). Interactions of deleterious and beneficial rhizosphere microorganisms and the effect of cropping practices. *Ann. Rev. Phytopathol.* 25:339-358.

Schwarz W. H. (2001). The cellulosome and cellulose degradation by anaerobic bacteria. *Appl Microbiol Biotechnol.* 56: 634–649.

Sharma H.C., Sharma K.K., Seetharama N.N. et Ortiz R. (2001). Genetic transformations of crop plants: risk and opportunities for the rural poor. *Curr Sci.* 80: 1495-1508.

Shahbaz, M., et Ashraf, M. (2013). Improving salinity tolerance in cereals. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 32(4), 237-249.

Siddiqui ZA. (2005). PGPR: Prospective biocontrol agents of plant pathogens. In: Siddiqui Z.A. (Ed.), *PGPR: Biocontrôle and biofertilization*. Springer, Pays-Bas, p.111-142.

Sonam S., Vijay K. et Tripathi R.B. (2011). Isolation of Phosphate Solubilizing Microorganism (PSMs) From Soil. *J. Microbiol. Biotech. Res.* 1: 90-95.

Subba Rao, N.S. (1982). Utilization of farm wastes and residues in agriculture. In N.S. Subba Rao, ed. *Advances in agricultural microbiology*, pp. 509-522. Oxford and IBH, UK, Mohan Prilani, and New Delhi, Butterworth and Co.

Sukumaran, R.K., R.R. Singhanian and A.Pandey. (2005). Microbial cellulases-Productions and challenges. *Journal of Scientific and Industrial Research.* 64: 832-844.

Sulbaran, M., E. Perez, M. Ball, A. Bahsas et L.A. Yarzabal .(2008). Characterization of the Mineral Phosphate Solubilizing Activity of *Pantoea agglomerans* MMB051 isolated from an IronRich Soil in Southeastern Venezuela (Bolivar State). *Curr. Microbiol.* 58:378-383.

Syed Shameer,T. N. V. K. V Prasad. (2017).Plant growth promoting rhizobacteria for sustainable agricultural practices with special reference to biotic and abiotic stresses.

T

Tabli N., Nabti E.H., Dahel D., Mokrane N., Manyani H., Dary M. and Megias M.G. (2014). Impact of Diazotrophic Bacteria on Germination and Growth of Tomato, with Bio-control Effect, Isolated from Algerian Soil. *J. Eco. Heal. Env*, 2: 1, 1-7.

Tariq M, Hameed S, Yasmeen T, Zahid M, et al. (2014) Molecular characterization and identification of plant growth promoting endophytic bacteria isolated from the root nodules of pea (*Pisum sativum* L.) *World J Microbiol Biotechnol* 30: 719-725.

Thakur D, Yadav A, Gogoi B.K et Bora T.C. (2007). Isolement et criblage de streptomycètes du sol des forêts protégées des états d'Assam et de Tripura pour des métabolites antimicrobiens. *Journal de Mycologie Médicale*. 17, 242-249.

Toussaint V. (1996). caractérisation d'un antibiotique produit par la souche d'actinomycète EF-76 antagoniste à *Phytophthora Fragariae* var. *rubica* causant le pourridié des racines du framboisier. Mémoire de Maîtrise ès science. Université de Sherbrooke, Québec, Canada.

Trotel-Aziz P, Couderchet M, Biagianti S et Aziz A. (2008). Characterization of new bacterial biocontrol agents *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Pantoea* and *Pseudomonas* spp. Mediating grape vine resistance against *Botrytis cinerea*. *Environmental and Experimental Botany*. 64, 23-32.

Twisha P. and P. B. Desai. (2014). Study on Rhizospheric microflora of Wild and Transgenic varieties of *Gossypium* species in Monsoon. *Res. J. Recent. Sci.* 3 : 42- 51.

Tozlu E., Karagöz K., Babagil G. E., Diziklisa T. and Elmhirst J. (2006). Profil de la culture des tomates de serre au Canada. Programme de réduction des risques liés aux pesticides Centre pour la lutte antiparasitaire Agriculture et Agroalimentaire Canada. *Agric. Agri. Food. Canada*. p50.

V

Valencia, L. G. H. (2008). Etudes des bases moléculaires de l'agrégation des sols par des exopolysaccharides bactériens, Université Joseph Fourier Grenoble 1, 196:22-23.

Van Loon, L.C. (2007). Plant responses to plant growth-promoting rhizobacteria. *Eur. J.Plant Pathol.* 119: 243-254.

Verma, L.N. (1993). Biofertiliser in agriculture. In P.K. Thampan, ed. *Organics in soil health and crop production*, pp. 152-183. Cochin, India, Peekay Tree Crops Development Foundation.

Vessey, J.K. (2003). Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant Soil* 255:571-586.

Vidyalakshmi R., Paranthaman R. and Indhumathi. J. (2009). Amylase Production on Submerged Fermentation by *Bacillus* spp. *World Journal of Chemistry* 4 (1): 89-91.

Vinoth R.S., Kanikkai R.A., Babu V.A., Manoj G.T., Naman H.S., Johnson A.J., Infant S.B. et Sathiyaseelan K. (2009). Study of starch degrading bacteria from kitchen waste soil in the production of amylase by using paddy straw. *Recent Research in Science and Technology* 1: 8-13.

Viollet A. (2010). Influence du système de sécrétion de type III bactérien dans les interactions plante-*Pseudomonas* spp. Fluorescents non pathogènes. Thèse de Doctorat de Microbiologie des Sols et de l'Environnement. Spécialité : Ecologie Microbienne. Université de Bourgogne. 364p.

Vitullo D, Di Pietro A, Romano A, Lanzotti V et Lima G. (2012) .Role of new bacterial surfactins in the antifungal interaction between *Bacillus amyloliquefaciens* and *Fusarium oxysporum*. *Plant Pathology.* 61, 689-699.

W

Walker, T.S., Bais, H.P., Grotewold, E., Vivanco, J.M. (2003). Root exudation and rhizosphere biology. *Plant Physiol.* 132, 44–51.
Wani, P.A., Khan, M.S., 2010. *Bacillus* species enhance growth parameters of chickpea (*Cicer arietinum* L.) in chromium stressed soils. *Food Chem. Toxicol.* 48, 3262–3267.

Wani, S.P. & Lee, K.K. (1992). Role of biofertilisers in upland crop production. In H.L.S. Tandon, ed. *Fertilisers, organic manures, recyclable wastes and biofertilisers*, pp.

Wang X., Mavrodi D.V., Ke L., Mavrodi O.V., Yang M., Thomashow L.S., Zheng N., Weller D.M. et Zhang J. (2014). Biocontrol and plant growth-promoting activity of rhizobacteria from Chinese fields with contaminated soils. *Microbial Biotechnology*. 8: 404-418.91-112. New Delhi, Fertiliser Development and Consultation Organization.

Weisskopf L. (2013). The potential of bacterial volatiles for crop protection against phytopathogenic fungi. In A. Méndez-Vilas (eds.), *Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education*, p1352-1363.

Wenke K, Wanke D, Kilian J, Berendzen K, Harter K et Piechulla B. (2012). Volatiles of two growth-inhibiting rhizobacteria commonly engage AtWRKY18 function. *The Plant Journal*. 70, 445-459.

Weyens N., Monchy S., Vangronsveld J., Taghari. and Lelie D. V. (2010). Plant- Microbe Partnerships (ed.), *Hand booh of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*. p. 547-257.

Whipps, JM. (2001). Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *J. Exp. Bot.* 52:487– 511.

Y

Yang Z, Liu S, Zheng D, Feng S. (2006). Effects of cadium, zinc and lead on soil enzyme activities. *J. Environ.*18 (6): 1135-1141.

You C, Zhang C, Feng C, Wang J et Kong F. (2015). *Myroideso doratimimus*, a biocontrol agent from the rhizosphere of tobacco with potential to control *Alternaria alternata*. *Bio Control*.60, 555- 564.

Z

Zeller, S.L., H. Brandt et B. Schmid (2007). Host-Plant Selectivity of Rhizobacteria in a Crop/Weed Model System. *PloS ONE*, 2(9): 1-7.

Zhou, Y. X. Yuan , X. Liang, L. Fang, J. Li, X. Guo, X. Bai, S. He. (2013). Enhancement of growth and intestinal flora in grass carp: The effect of exogenous cellulose. *Aquaculture* 7: 416–417.

Annexes

Annexes

Composition des milieux de culture utilisés (pour un litre de milieu)

Gélose nutritive (GN)

Peptone	5g
Extrait de viande.....	1g
Extrait de levure	2g
NaCl.....	5g
Agar	7.5g
pH	7.2±0.2

Luria Bertani (LB)

NaCl.....	5
Tryptone	10
Extrait de levure	5
pH.....	7.2±0.2

Gelose à l'extrait de malt (EM)

Extrait de malt	30
Peptone mycologique	5
Agar	15
pH	5.4± 0.2

Tampon phosphate salin (PBS)

NaCl.....	8
KCl.....	0.2
KH ₂ PO ₄	0.24
Na ₂ HPO ₄	1.44
pH.....	7.0±0.2

Plat count agar (PCA)

Glucose	1
Tryptone	5
Extrait de levure.....	2.5
Agar.....	12
pH.....	7.0±0.2

Résumé : En vue du risque augmenté des maladies des plantes causé par les champignons phytopathogènes, nous nous sommes intéressés dans notre travail à la recherche de bactéries productrices de substances antifongiques. 8 échantillons de sols prélevés de Bejaia et Alger ont fait l'objet de cette étude, dont 82 isolats ont été purifiés, puis testés pour la production de substances antifongiques (HCN, NH₃ ...etc.) et pour la production de l'AIA et d'enzymes lytiques (protéase, chitinase, cellulase...etc.). Les résultats obtenus ont montré que 15 (18,26%) isolats ont la capacité à inhiber la croissance d'au moins un parmi les 3 champignons phytopathogènes (*Aspergillus niger*, *Botrytis cinerea* et *penicillium sp.*) avec des pourcentages respectifs (66,66%; 33,33%, 46,66%). La recherche des caractères antagonistes et promoteurs de la croissance végétale par nos isolats sélectionnés montrent les résultats suivantes: production de substances volatiles avec un pourcentage de production de 80%, l'AIA(100%), production d'HCN(6,66%), production de NH₃ (93,33%), d'enzymes lytiques (lipase (60%), estérase (40%), cellulase (34,7%), protéase (80%), amylase (66,66%), uréase (20%), chitinase (6,66%), phosphatase (13,33%)). Ces résultats ne nous permettent pas d'expliquer exactement les mécanismes d'antagonismes par lesquels ces isolats ont inhibé le développement des champignons phytopathogènes, mais, il a été clairement déterminé que la cohabitation entre les isolats inhibiteurs et les champignons phytopathogènes n'est pas possible.

Mots clés : PGPR, substances antifongiques, HCN, NH₃, AIA, activité enzymatiques.

Abstract: In view of the increased risk of plant diseases caused by phytopathogenic fungi, in our work we were interested, for searching of bacteria producing antifungal substances. Soils collected from Bejaia and Algiers were the subject of this study, 82 isolates were purified then tested for the production of antifungal substances (HCN, NH₃, etc.) and for the production of AIA and lytic enzymes (protease, chitinase, cellulase, etc.). The results obtained showed that just 15 (18.26%) isolates have the ability to inhibit the growth at least one of the three phytopathogenic fungi (*Aspergillus niger*, *Botrytis cinerea* and *penicillium sp.*) with respective percentages (66.66%, 33.33%, 46.66%). The search for antagonistic characters and promoters of plant growth show the following results: production of volatile substances with a production percentage of 80%, AIA (100%), HCN production (6.66%), production of NH₃ (93.33%), lytic enzymes (lipase (60%), esterase (40%), cellulase (34.7%), protease (80%), amylase (66.66%), urease (20%), chitinase (6.66%), phosphatase (13.33%)). These results did not explain the antagonistic mechanisms by which these isolates inhibited the development of pathogenic fungi, however, it was clearly determined that cohabitation between inhibitory isolates and phytopathogenic fungi is impossible.

Key words: PGPR, antifungal substances, HCN, NH₃, AIA, Enzymatic activity