

Réf :.....

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

MASTER

Thème

**Sélection de quelques bactéries
rhizosphériques pour le biocontrôle *in vivo*
d'un champignon phytopathogène**

Présenté par :

Mlle AIT DAOUD Sabrina et Mlle AIT HELLAL Anissa

Soutenu le : 23 Septembre 2021

Devant le jury composé de :

M. NABTI E.	Professeur	Président
Mme. BENSIDHOUM L.	MCB	Promotrice
M. AMIR N.	MCA	Examineur

Année universitaire : 2020 / 2021

REMERCIEMENTS

Avant tout, nous remercions Allah le tout puissant de nous avoir accordé courage et
bénédictioin pour accomplir ce travail.

On tient à exprimer nos profondes reconnaissances à Mme BENSIDHOUM Leila, notre
promotrice, pour son suivi attentif, son soutien, son enthousiasme et ses conseils avisés tout
au long de ce travail.

Nous remercions particulièrement Mr. NABTI El-Hafid, d'avoir mis à notre disposition son
laboratoire pour la réalisation de notre travail, et d'avoir accepté de présider le jury de notre
soutenance,

Nous remercions Mr. AMIR Nadir d'avoir accepté d'examiner notre travail.

Nous remercions également, l'équipe Biomasse et Environnement du Laboratoire de Maitrise
des Energies Renouvelables : Mr. ABBACI Hocine et Mme KHELLOUFI Nouria pour leur
disponibilité, leur aide et leur conseils.

Merci à tous qui ont participé, de près ou de loin, à la réussite de ce travail.

Dédicaces

A mes chers parent Hassina et mahdi

Vos sacrifices étaient toujours la source de ma force, c'est votre soutien qui m'a permis d'arriver à ce jour, ce que je suis aujourd'hui et tout ce que je fais est un remerciement pour votre patience, votre générosité et vos efforts pour mon bien être.

A mon frère Moho et mes deux sœurs Kahina et Halima qui ont cru en moi. Merci d'être toujours à mes côtés

Pour toutes ma famille et toutes mes copines

Anissa

Dédicaces

Je dédie affectueusement ce travail

A mes chers parents

A mes frères et Sœurs

A toutes ma famille

A tous mes amis

Sabrina

Liste des abréviations

AIA: Acide Indole Acétique

BCA's: Biological Control Agent

COV's : Composés Organiques Volatiles

DAPG: 2,4 -Diacétyl phluoro glucinol

GN : Gélose Nutritive

HCN : Hydrogen Cyanide

LB : Luria Bertani

PBS: Phosphate Buffer Salin

PDA: Potato Dextrose Agar

PCA: Plate Count Agar

PGI: Percentage Growth Inhibition

PGPB: Plant Growth Promoting Bacteria

PGPR: Plant Growth Promoting Rhizobacteria

Liste des figures

N°	Titre	Page
1	Triangle de la maladie	3
2	Symptômes de l'aspergillose sur l'ail (A) et l'oignons (B)	4
3	Localisation géographique de la zone des prélèvements	13
4	Les étapes d'isolement bactérien	14
5	Les espèces fongiques testées	15
6	Mise en évidence de l'effet antagoniste des isolats bactériens à l'égard des champignons phytopathogènes testés	15
7	Les étapes suivies pour la mise en évidence de la production des COV's	18
8	Les étapes de désinfection et de germination des graines du Maïs	19
9	Les différentes étapes suivies dans le test <i>in vivo</i> sur les pommes	21
10	Activité antifongique de quelques isolats sur <i>A. flavipes</i>	22
11	Activité antifongique des isolats F3.1 et F3.2 sur <i>Fusarium</i> sp.	23
12	Activité antifongique des isolats E5, F3.1 et F3.2 sur <i>A. niger</i>	23
13	Activité antifongique des isolats E5, F3.1 et F3.2 sur <i>Penicillium</i> sp.	23
14	Pourcentage d'inhibition de la croissance des champignons phytopathogènes par les isolats bactériens	24
15	Résultats de test de production de l'ammoniac comparés au témoin négatif	27
16	Résultats de la production d'HCN	28
17	Aspect des résultats positif des activités enzymatiques de quelques isolats	29
18	Aspect des résultats positifs de la production d'AIA	32
19	Les différentes concentrations d'AIA produites par les isolats bactériens	32
20	Aspect des pommes témoins (eau physiologique)	35
21	Aspect des pommes traitées par l'isolat F _{3,1}	35
22	Aspect des pommes infectées par l'agent phytopathogène (<i>A. niger</i>)	35
23	Aspect des pommes infectées par l'agent phytopathogène (<i>A. niger</i>) et traitées par l'isolat F _{3,1}	35

Liste des tableaux

N°	Titre	Page
I	Exemple de maladie phytopathogènes et agents de lutte	10
II	Résultats des tests de production de métabolites antifongiques	26
III	Résultats des différents tests de d'activités enzymatiques	29

Sommaire

Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Introduction	1

Synthèse bibliographique

1. Les champignons phytopathogènes	3
1.1. Les champignons pathogènes et maladies des plantes.....	3
1.2. Exemple de champignons phytopathogènes : <i>Aspergillus niger</i>	4
2. La lutte contre les champignons phytopathogènes	4
2.1. La lutte physique.....	5
2.2. La lutte naturelle.....	5
2.3. La lutte chimique.....	5
2.4. La lutte intégrée.....	6
2.5. La lutte biologique.....	6
2.5.1. Les agents de lutte biologique.....	6
2.5.2. Les mécanismes d'action	9
2.5.3. Intérêt de la lutte biologique dans le biocontrôle des agents phytopathogènes	12

Matériel et méthodes

1. Isolement des bactéries rhizosphériques	13
1.1. Échantillonnage.....	13
1.2. Isolement et purification.....	14
2. Test d'activité antifongique	14

3. Recherche de métabolites spécifiques à activité antifongique	16
3.1. Production d'ammoniac (NH ₃).....	16
3.2. Production de cyanure d'hydrogène (HCN).....	16
3.3. Production d'enzyme.....	16
3.3.1. Chitinase.....	16
3.3.2. Protease.....	17
3.3.3. Cellulase.....	17
3.4. Production de composés volatiles (COVs).....	17
4. Production de l'acide indole acétique (AIA)	18
5. Effet de l'inoculation bactérienne sur la croissance de Maïs et l'inhibition de développement d'<i>Aspergillus niger</i>	18
5.1 Désinfection et germination des graines de maïs.....	18
5.2. Préparation de la culture bactérienne et fongique.....	19
5.3. Inoculation et semis des graines de Maïs	19
6. Test d'antagonisme des isolats sélectionnés à l'égard d'<i>Aspergillus niger</i> sur fruits de pomme	20

Résultats et Discussion

1. Isolement des bactéries rhizosphériques.....	22
2. Mise en évidence de l'activité antifongique des isolats.....	22
3. Recherche de métabolites spécifiques à activités antifongiques	26
3.1. Production de NH ₃ et de l'HCN.....	26
3.2. Production d'enzymes	28
3.3. Production de composés volatiles (COVs).....	31
3.4. Production d'AIA.....	32
4. Effet de l'inoculation bactérienne sur la croissance de Maïs et l'inhibition de développement d'<i>Aspergillus niger</i>	33

5. Test d'antagonisme des isolats sélectionnés à l'égard d'<i>Aspergillus niger</i> sur fruits de pomme.....	34
Conclusion	37
Références bibliographiques.....	39
Annexes	

Introduction générale

Introduction

Les organismes phytopathogènes représentent l'un des problèmes majeurs en agriculture. D'après les estimations de la production agricole mondiale, 50 % de culture végétales sont perdues avant ou après la récolte (Choudhary et al., 2009). Les champignons phytopathogènes sont responsables d'une grande partie de cette perte, ils imposent une menace majeure pour la santé des plantes et la production agricole.

Pendant les trois dernières décennies, les agriculteurs sont devenus dépendants des produits chimiques comme moyen relativement fiables de protection des cultures, en raison de leurs performances et leur facilité d'application (Jan et al., 2011). Cependant l'utilisation non contrôlée de ces produits, entraîne des risques sur la santé publique et environnementale, et peut provoquer une stimulation des systèmes de résistance des agents pathogènes à ces produits (Nasraoui, 2006). Ils peuvent également être à l'origine d'un déséquilibre dans l'écosystème naturel par leur effet négatif sur la microflore rhizosphérique (Singh et al, 2019).

Les travaux de recherche s'orientent désormais vers la recherche de méthodes alternatives impliquant de nouveaux moyens de contrôle dans l'espoir de remplacer les agents de lutte chimique, par des agents biologiques comme étant une nouvelle approche de lutte ou comme composante prometteuse de la lutte intégrée (Emmert et Handelsman, 1999).

La lutte biologique contre les champignons phyto-pathogènes est un moyen de lutte naturel qui utilise des microorganismes antagonistes isolés de l'environnement naturel dans lequel ils entrent en compétition avec des microorganismes pathogènes (Grzegorzczuk et al, 2017).

Il est bien établi que les bactéries rhizosphériques sont de bon agents de biocontrôle, de ce fait, il est proposé dans ce travail de :

- Sélectionner des isolats bactériens antagonistes ;
- Rechercher quelques métabolites impliqués dans la lutte contre les champignons phytopathogènes
- Tester *in vivo* l'effet antagoniste des isolats sélectionnés sur le Maïs et les fruits de pommes

Ce document est ainsi divisé en trois parties : la première partie est consacrée à la synthèse bibliographique relative au sujet, la deuxième partie est réservée à la présentation de l'ensemble des tests effectués *in vitro* et *in vivo* et la troisième partie représente les résultats obtenus et leur discussion.

Synthèse bibliographique

1. Les champignons phytopathogènes

1.1. Les champignons pathogènes et maladies des plantes

Les champignons sont des organismes vivants eucaryotes unicellulaires ou pluricellulaires appartenant au règne des *Fungi* qui se reproduisent par l'intermédiaire de spores, ils représentent l'un des groupes les plus importants des organismes vivants, et jouent un rôle crucial dans de nombreux écosystèmes (Mueller et Schmit, 2007). Dans la nature, les champignons apparaissent sous forme de spores qui est un moyen de conservation et de survie pour le champignon et qui lui permettent de se propager dans la nature. Les plantes peuvent être considérées comme l'hôte des champignons phytopathogène. Le premier contact entre l'hôte et le champignon est maintenu par une relation saprophytique qui se développe par la suite en une relation de parasitisme. Lors de cette relation, le champignon colonise totalement la plante et déclenche ces premiers processus infectieux (Nasraoui, 2006).

L'apparition de la maladie chez la plante nécessite en premier lieu un contact entre l'agent pathogène et l'hôte sous des conditions environnementales favorables. Ces trois facteurs (hôte, agent pathogène et environnement) forment un triangle appelé : le triangle de la maladie (fig.1).

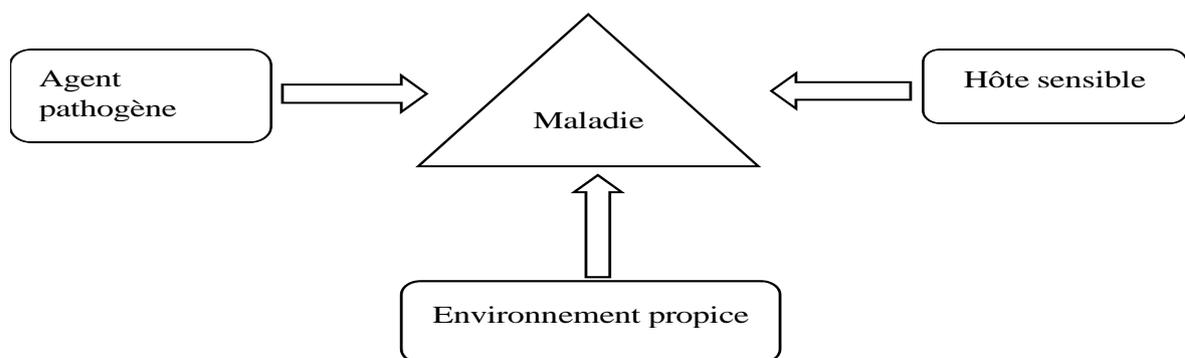


Figure 1 : Triangle de la maladie

Les organismes phytopathogènes sont parfois regroupés par types de symptômes, d'organes affectés ou de plantes affectées. Cependant, le critère approuvé dans la classification est l'agent phytopathogène responsable de la maladie (Nasraoui, 2006).

1.2. Exemple de champignons phytopathogènes : *Aspergillus niger*

Aspergillus niger est un champignon phytopathogène responsable de la «pourriture noire» chez les fruits et les légumes. C'est le contaminant le plus courant des aliments stockés, il est responsable de la pourriture des fruits frais et des céréales (Lima et al, 2019). *Aspergillus niger* est également responsable de la moisissure des bulbes d'oignon il touche fréquemment : les oignons entreposés, les bulbes d'échalote, l'ail, les céréales, les graines du cacao et du café. Ce champignon est caractérisé par la production abondante de conidiospores, ces derniers une fois propagés dans l'air, assurent l'apparition d' *A. niger* dans les régions chaudes et humides (Lima et al, 2019) mais également dans les sols sec et chauds (Dedi et Diomande, 2017). *A. niger* est capable de produire des acides organiques et des mycotoxines tel que l'ochratoxine A (El khoury et al., 2006).

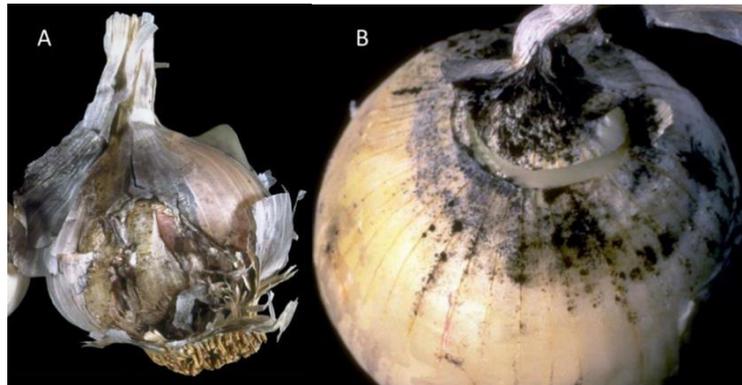


Figure 2: Symptômes de l'aspergillose sur l'ail (A) (Anonyme 1, 2021) et l'oignons (B) (Anonyme 2, 2021)

2. La lutte contre les champignons phytopathogènes

Les organismes phytopathogènes représentent l'un des problèmes majeurs en agriculture. D'après les estimations de la production agricole mondiale, 50 % de culture végétales sont perdues avant ou après la récolte (Choudhary et al., 2009).

Pour lutter contre ces ravageurs et minimiser les risques d'ordre économique, écologique et les risques pour la santé humaine, plusieurs moyens de luttés sont appliqués (Hallenbeck et al., 2012). La plupart de ces moyens sont dirigés pour protéger

les plantes saines des maladies plutôt que de soigner les plantes atteintes des pathologies (Nasraoui, 2006).

2.1. La lutte physique

La lutte physique regroupe un ensemble d'agents physiques qui peuvent être employés pour lutter contre les maladies des plantes, comme la température (haute ou basse), l'air sec, la lumière à une longueur d'onde défavorable, les radiations, etc. (Nasraoui, 2006).

La lutte physique est représentée par deux méthodes principales qui sont appelées les méthodes actives et passives. La méthode active consiste à l'utilisation de l'énergie durant son application afin de détruire, stresser et blesser les phytopathogènes. La méthode passive s'effectue par une modification du milieu dans le but de créer les conditions défavorables aux pathogènes et les conditions favorables pour la plante, ce type est considéré plus durable que la méthode active qui agissent qu'au moment de l'application.

Une autre classification pour les méthodes physiques peut être impliquée, selon le mode d'utilisation d'énergie, dont les types sont : lutte mécanique, lutte thermique, lutte électromagnétique et lutte pneumatique (MAA, 2012).

II.2. La lutte naturelle

Certaines plantes peuvent présenter la capacité de lutter contre les maladies causée par les phytopathogènes. La lutte naturelle peut s'effectuer par deux méthodes différentes : cultiver les plantes de lutte en association avec celle qui peuvent être attaquée par des ravageurs ou pulvérisation d'un produit préparé à partir des plantes de lutte par plusieurs techniques (infusion, décoction, macération, purin) (asbl Tournesol-Zonnebloem vzw, 2014).

2.3. La lutte chimique

La lutte chimique consiste à l'utilisation de produits chimiques, tels que les pesticides (fongicides, antibiotique, etc.). La plupart de ces produits affectent directement le métabolisme vital des ravageurs (la respiration, la biosynthèse des métabolites, etc.). Malgré leur efficacité, la lutte chimique entraîne des risques sur la santé publique et environnementale, d'autre part elle provoque une stimulation des systèmes de résistances des ravageurs contre ces produits (Nasraoui, 2006).

2.4. La lutte intégrée

La lutte intégrée s'ouvre à tout type possible de méthode de protection contre les maladies fongiques des plantes. Cette protection vise à éliminer ou inhiber la croissance de l'inoculum initial et son efficacité, immuniser ou améliorer la résistance de la plante, retarder l'installation de la maladie et ralentir les cycles secondaire du pathogène (Nasraoui, 2006). La protection intégrée est l'ensemble des moyens de protection contre les organismes nuisibles. Elle est basée sur l'utilisation des différents moyens de lutte dans le but de minimiser les risques économiques et les risques environnementaux (Van Lentern, 2012).

2.5. La lutte biologique

La lutte biologique contre les agents pathogènes est une sous-discipline établie dans la science de la phytopathologie qui consiste à l'utilisation des microorganismes ayant un effet antagoniste pour réduire les maladies causée par les phytopathogènes, l'effet antagoniste résulte par différent mode d'action appliquer par l'agent de lutte (Pal et Gardener, 2006 ; Paulitz et Bélanger, 2001). Cette lutte apparait comme très fructueuse grâce à la grande diversité des microorganismes présents dans les différents écosystèmes. Les agents de lutte sont utilisés non seulement pour lutter contre les maladies des plantes au cours de leur croissance, mais aussi pour lutter contre les maladies survenant lors du stockage des fruits (post récolte) (Lugtenberg et Kamilova, 2009).

2.5.1. Les agents de lutte biologique

Au regard des inconvénients de l'utilisation des fongicides chimiques, l'utilisation de microorganismes bénéfiques est une alternative prometteuse pour lutter contre les phytopathogènes tout en diminuant l'emploi des produits chimiques (Bensidhoum, 2016). Les organismes bénéfiques utilisés dans la lutte contre les phytopathogènes, sont choisis selon les critères suivants:

- Efficacité et pouvoirs antagoniste spécifiques ;
- Pouvoir d'adaptation aux différentes conditions biotiques et abiotiques ;
- Inactifs sur les hôtes non ciblés ;

- Mécanismes de lutte qui leur permettent d'inhiber le développement de l'agent pathogène et de réduire l'incidence de la maladie qu'il provoque (Weeden et al, 2007 ; Errakhi, 2008).

- **Les champignons**

Les champignons mycorhiziens : Ils sont décrits comme des champignons bénéfiques qui entrent en interaction symbiotique avec les racines des plantes. L'interaction entre la plante et les champignons mycorhiziens est caractérisée par un effet bénéfique et réciproque dans lequel la plante fournit aux champignons un habitat et des nutriments, et en retour les champignons confèrent aux racines des plantes une protection contre les agents phytopathogènes (Smith et Read, 2008). Pendant les premiers stades de la mycorhization, les champignons mycorhiziens secrètent des éliciteurs susceptibles d'induire des réactions de défense chez la plante qu'ils colonisent (Salzer et Boller, 2000).

Les champignons endophytes : Toutes les espèces végétales abritent une flore fongique constituée de champignons non pathogène dites endophytes. Leur fonction écologique apparaît dans la participation au métabolisme d'adaptation des plantes à leur environnement. Ces espèces fongiques exercent un pouvoir protecteur pour les plantes, elles sont d'ailleurs qualifiées de mutualistes. Une des composantes de ce mutualisme est la production de molécules bénéfique caractérisées par leur propriétés anti-phytopathogènes, ou encore hormonale stimulatrice de la croissance des plantes (Combès et al., 2012).

D'autres types de champignons interviennent également dans la protection des plantes et la lutte contre les ravageurs, en particulier les insectes. Ils sont utilisés dans de nombreux test de lutte biologique, qui ont confirmé leur efficacité dans l'élimination de plusieurs prédateurs.

- **Les bactéries**

De nombreuses études ont prouvé que l'utilisation des bactéries comme une alternative dans la lutte biologique, jouent un rôle important dans la protection des plantes et dans l'amélioration du rendement des culture (Niranjan et al., 2005). Ces microorganismes possèdent de nombreux mécanismes (substance bioactives, enzymes, sidérophores, phytohormones, comportement environnemental, etc.) qui se traduisent par leurs activités fongicide, insecticide, nématocide ou encore stimulatrice de la croissance des plantes. Ces

bactéries constituent d'excellents agents de lutte biologique, et Plusieurs d'entre elles ont été rapportés comme microorganismes antagonistes en particulier les souches du genre *Bacillus*, *Pseudomonas* et *Burkholderia* (Lodewyckxal et al, 2002).

- **Les nématodes**

Il y a une attention constante dans l'emploi de nématodes dans la lutte contre les insectes parasites des végétaux (Park et al, 2012), ils sont appelés nématodes entomopathogènes ou nématodes de lutte biologique (Barberchek, 2011) .

Les nématodes entomopathogènes sont des organismes terricoles naturellement présents dans l'eau pelliculaire entourant les particules du sol (Barberchek ,2011). Parmi les espèces les plus utilisées dans la lutte contre les insectes nuisibles, celles appartenant aux deux genres *steinernematidae* et *heterorhabditidae*, qui regroupent des espèces libérant des bactéries entomoparasites. Les nématodes emploient différentes stratégies pour trouver leur insecte hôte, ils détectent leurs insectes hôtes au moyen d'indices chimiques, thermiques, tactiles ou vibratoires (Tucson, 2011).

- **Les algues**

Une autre voie prometteuse et alternative aux agents de lutte chimiques est l'utilisation des algues et leurs produits. Ils peuvent être considérer comme l'un des principaux agents biologiques pour le contrôle des maladies phytopathogènes, grâce à leurs capacité à produire des composés biologiquement actifs (Berry et al, 2008).

Les activités biologiques des algues sont attribuées aux composées phénoliques, polyphénols, tocophérols, glucides, protéines, huiles, substances allélochimiques et sesquiterpènes (El-Mougry et al, 2013). Ces composés agissent par plusieurs mécanismes : modifications structurelles et fonctionnelles, perturbation mitotique de la membrane cytoplasmique ou par inactivation des enzymes et inhibition de la synthèse des protéines dans le micro organe ciblé (Swain et al, 2017 ; Renuka et al, 2018).

L'addition des microalgues dans les cultures végétales stimule le système immunitaires des plantes contre les pathogènes à travers les différents processus métaboliques des plantes, tels que l'activation des enzymes ayant une fonction de défense, ou par la stimulation de la production et l'action de composées antioxydants (Renuka et al, 2018).

2.5.2. Les mécanismes d'action

Les agents de lutte biologique emploient plusieurs mécanismes dans leur lutte contre les ravageurs de cultures. Par action direct ou indirecte, ces microorganismes donnent des résultats encourageants qui permettent de classer la lutte biologique comme une alternative prometteuse à l'utilisation des traitements chimiques.

- **La compétition**

C'est un mécanisme très utilisé par les bactéries dans leur lutte contre les champignons, il est définie comme la consommation ou le contrôle de l'accès aux nutriments, à l'espace ou à tout autre facteur dont la disponibilité est limitée (Widén, 1994). L'élimination de l'infection des champignons pathogènes par compétition pour l'habitat et les nutriments s'est révélée efficace, en effet, les champignons sont très sensibles à la concurrence car leurs cycle de vie nécessite une nutrition externe notamment pour transmettre leur pathogénicité, de même, la compétition des bactéries près des spores du pathogène pour l'obtention d'éléments nutritifs, peut entraîner une inhibition accrue de la germination des spores de ce dernier (Elad et Stewart, 2004 ; Haidar et al., 2016). Ce facteur critique qualifie cette interaction comme moyen efficace en matière de biocontrôle (Lugtenberg et Kamilova , 2009).

La réussite de la lutte biologique nécessite l'application d'un agent de biocontrôle efficace. L'efficacité est notamment liée à la capacité de l'agent de lutte biologique à coloniser et à s'installer dans le milieu rhizosphérique des plantes (Singh et al., 2003).

- **L'antibiose**

C'est le mode d'action le plus étudié chez les agents de lutte biologique, il consiste en la production par l'agent antagoniste des substances bioactives contre l'agent pathogène. Ces substances sécrétées peuvent être des antifongiques ou des antibiotiques dont le rôle principale et de ralentir ou bloquer la croissance de l'agent pathogène en agissant sur une étape essentielle de leurs cycle de développement (Corbaz, 1990). Plusieurs microorganismes, en particulier les bactéries, sont classifiés comme agents de lutte pour leur capacité à produire des molécules bioactives comme les phénazines et les DAPG (2,4 diacétyl phluoglucinol) (Weller ,2007), et des composés bioactifs volatiles comme le cyanure d'hydrogène, l'ammoniac, 2,3-butanediol et l'acétoïne (Ahmed et al., 2008).

- **Enzymes Hydrolytiques**

Divers micro-organismes sécrètent d'autres métabolites qui peuvent interférer avec la croissance et/ou les activités des agents pathogènes. Ces métabolites peuvent être des enzymes hydrolytiques qui peuvent hydrolyser une grande variété de composés polymère, notamment la chitine, les protéines et la cellulose qui sont des constituants de la paroi cellulaire de nombreux champignons phytopathogènes. La production de ces enzymes participe potentiellement à la suppression des agents pathogènes et de leur activités (Pal et Gardener, 2006 ; Vega et Kalkum, 2012).

- **La résistance systémique induite (ISR)**

L'induction de système de résistance des plantes, rend la plante beaucoup plus résistante aux futures agressions des agents pathogènes. Cette résistance est établie par production de substances protéiques associées à la réponse des plantes aux attaques des agents pathogènes, inhibitrice de certains enzymes impliqués dans le pouvoir pathogène (Pal et Gardeer, 2006) et par des modifications morphologiques des organes structurels comme l'épaississement des structures pariétales dans le but de renforcer les barrières physiques face aux agressions. La colonisation efficace des racines par les microorganismes est un événement essentiel pour l'expression optimale de l'activité de biocontrôle agissant par l'ISR (Bloemberg et Lugtenberg, 2001), où la population bactérienne doit atteindre un niveau suffisant sur les racines pour déclencher le phénomène (Raaijmakers et al. 1995).

Ci-dessous un tableau représentant quelque exemple de maladies phytopathogènes, les agents responsables ainsi que les agents de lutte.

Tableau I : Exemple de maladie phytopathogènes et agents de lutte

Champignon	Plante	Maladie et Symptômes	Agent de bio-contrôle	Références
<i>Botrytis cinerea</i>	Les grappes de raisins	La pourriture grise 	<i>Aureobasidium pullulans</i>	Galli et al, 2021

<i>Bremia lactucae</i>	La laitue	Mildiou de la laitue Jaunissement des feuilles, brunissement puis sécheresse rapide. 	<i>Bacillus subtilis</i>	Brabandt et al, 2014
<i>Monilia Fructigena</i>	Pêcher	Moniliose Taches et perforation des feuilles et pourriture brune du fruit après récolte 	<i>Pseudomonas Synxantha</i>	Aiello et al., 2019
<i>Rhizopus Stolonifer</i>	Les fraises et les mûres	Pourriture des fruits, moisissure chevelue 	<i>Bacilus Subtilis</i>	Chavez-Diaz et al, 2013)
<i>Cephalosporium maydis</i>	Le Mais	Flétrissement tardif Jaunissement tardif des feuilles 	<i>Pseudomonas Koreensis</i>	Ghazi et El-Nahrawi, 2021)
<i>Phomopsis amygdali</i>	Amandiers	Chancre à fusicoccum, flétrissement du bois 	<i>Trichoderma viride</i> et <i>T. harzianum</i> ,	Rhaouma et Triki, 2008
<i>Alternatia brassicicola</i>	Choux fleurs	Alternariose : taches brunes ou noire nécrotiques 	<i>Streptomyces hydrogenans</i>	Manhas et Kaur, 2016

2.5.3. Intérêt de la lutte biologique dans le biocontrôle des agents phytopathogènes

La lutte biologique est un moyen considéré comme alternatif à l'utilisation des produits chimiques, ce moyen représente de nombreux avantages de point de vue sanitaire, économique et environnementale (Lefort , 2010) :

- Ne présente pas d'effets phytotoxiques sur les plantes et ne provoque pas une perte prématurée des fruits et des feuilles.
- Permet l'augmentation de rendement des cultures agricoles.
- Réduit les risques de pollution.
- Moyen à faible coût.
- L'agent de lutte se caractérise par sa distribution facile, sa grande spécificité d'action et sa persistance dans la nature.
- Préserve la biodiversité

Matériel et méthodes

Ce présent travail a été réalisé au niveau du laboratoire de Maîtrise des Energies Renouvelables (Equipe Biomasse et Environnement). Les expériences ont été menées durant une période de 3 mois (Avril-Juin 2021). Le but de ce travail est l'isolement et la sélection des isolats bactériens qui peuvent être utilisés comme agent de biocontrôle. Pour atteindre cet objectif, plusieurs expériences ont été menées. Elles ont été organisées en trois parties.

- *Partie 1* : Echantillonnage, Isolement et purification des isolats bactériens
- *Partie 2* : Sélection des isolats actifs, suite aux tests *in vitro* de pouvoir antagoniste des isolats et de leur capacité à produire des molécules antifongiques
- *Partie 3* : Évaluation de la capacité des meilleurs isolats à contrôler *in vivo* *Aspergillus Niger* sur les plantes de Maïs et sur les pommes.

1. Isolement des bactéries rhizosphériques

1.1. Echantillonnage

Les échantillons de sols sont prélevés à partir de la zone rhizosphérique des tomates à Seddouk ouedda, Bejaia (latitude : 36.51864, longitude : 4.70308) (fig. 3). Les échantillons ont été par la suite transportés au laboratoire dans des flacons stériles.



Figure 3: Localisation géographique de la zone des prélèvements (image google maps)

1.2. Isolement et purification

Une série de dilution allant jusqu'à 10^{-8} est préparée à partir d'une solution mère (fig. 4), contenant 1g du sol et 9 ml d'une solution de tampon phosphate salin (PBS) (annexe I). Cette opération est suivie par un ensemencement sur milieu Plate Count Agar (PCA) (annexe II) par inondation. Les boîtes sont ensuite incubées à 30°C pendant 48 h à 72 h.

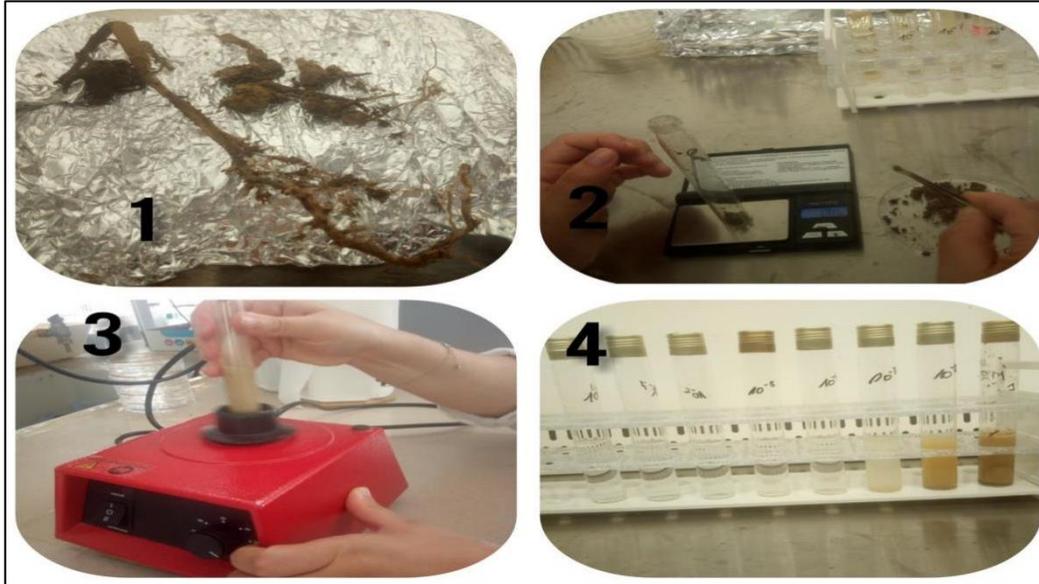


Figure 4: Les étapes d'isolement bactérien

1-Prélèvement de la rhizosphère ; 2- La pesée de l'échantillon du sol / 3- Homogénéisation du mélange sol/PBS ; 4- Série de dilution à partir de la solution mère

Après 48h d'incubation, les colonies différentes phénotypiquement (taille, couleur, forme, pigment produit, ...) sont ensemencées sur gélose PCA, par la suite des repiquages successifs sont effectués sur le même milieu d'isolement jusqu'à l'obtention des colonies pures.

2. Test d'activité antifongique

Le pouvoir antagoniste des isolats est testé sur 4 espèces fongiques, il s'agit d'*Aspergillus niger* ; *Aspergillus flavipes* ; *Penicillium* sp. et *Fusarium* sp. (Souches provenant de Laboratoire de Maitrise des Energies Renouvelables, université de Bejaia). Les cultures jeunes des champignons sont obtenues par repiquage sur milieu Potato Dextrose Agar (PDA) (Annexe II), dans le but d'obtenir des cultures jeunes (fig. 5)

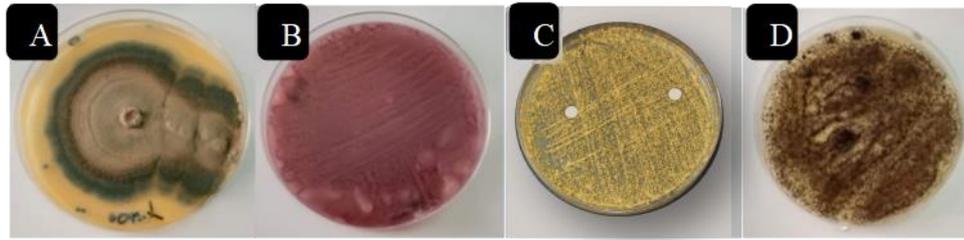


Figure 5: Les espèces fongiques testées (A) : *Penicillium* sp. ; (B) : *Fusarium* sp. ; (C): *Aspergillus flavipes* ; (D) : *Aspergillus niger*.

L'activité antagoniste des isolats a été effectuée selon la méthode de confrontation sur gélose (Sagahón et al., 2011). Cette technique consiste à découper un disque de champignon de 8mm de diamètre à partir d'une culture jeune et le déposer au milieu d'une boîte contenant le milieu PDA. Quatre spots de suspensions bactériennes (à raison de deux spots pour chaque isolat) sont déposés à une distance de 2,5 cm du champignon. Des boîtes de Pétri ne contenant que le champignon cible sont préparées en parallèle pour servir de témoin. Toutes les boîtes sont incubées à $25 \pm 2^\circ\text{C}/5-7\text{J}$ (fig. 6).

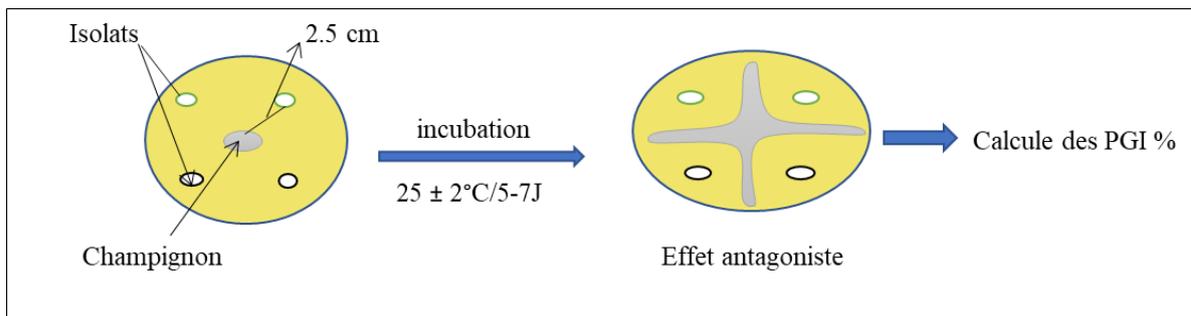


Figure 6 :_Mise en évidence de l'effet antagoniste des isolats bactériens à l'égard des champignons phytopathogènes testés.

L'effet antifongique est évalué par la détermination du pourcentage d'inhibition de la croissance (PGI%) selon la formule décrite par (Whipps, 1987) :

$$\text{PGI}\% = \left(\frac{R1-R2}{R1} \right) \times 100$$

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

R2 : Distance en mm entre le point dépôt du champignon et la marge de la colonie contenue dans la boîte de pétri traitée.

3. Recherche de métabolites spécifiques à activité antifongique

3.1. Production d'ammoniac (NH₃)

Les isolats bactériens sont testés pour leur capacité à production de l'ammoniac dans l'eau peptonée (Annexe II). 100µl d'une culture bactérienne jeunes sont inoculés dans 10 ml d'eau peptone, puis incubés à 30°C pendant 96h. La lecture du test se fait par l'ajout de 500µl du réactif de Nessler dans chaque tube, le développement d'une couleur jaune ou orange indique une production de l'ammoniac (cappuccino et Sherman, 1992).

3.2. Production de Cyanure d'hydrogène (HCN)

Suivant la méthode décrite par Lorck (1948), la recherche de la production d'HCN est effectuée par ensemencement en stries des isolats bactériens sur milieu Gélose nutritive (GN) (Annexe II) additionné de glycine (4.4 g/l). Un disque de papier wattman imprégné d'une solution de picrate de sodium (5% d'acide picrique et 2% de carbonate de sodium anhydre) est déposé au fond du couvercle de la boîte. Ces dernières sont scellées avec du parafilm. La lecture du test s'effectue après incubation à 30°C pendant 96h. Le test positif se traduit par une variation de la couleur du papier wattman du jaune vers une couleur orange à marron.

3.3. Production d'enzymes

La recherche des activités enzymatiques est effectuée par ensemencement en spots de 10 µl des cultures bactériennes jeunes sur les différents milieux contenant les substrats des enzymes recherchées.

3.3.1. Chitinase

L'activité chitinolytique reflète le pouvoir d'un microorganisme à dégrader la chitine qui est un composé structural des champignons. Le protocole de mise en évidence de l'activité chitinolytique consiste à déposer des spots de 10µl de chaque culture bactérienne sur un milieu préconisé pour la production de chitinase, composé en g/l de (0,6-0,8) de chitine colloïdale, (2,7) K₂HPO₄, (0,3) KH₂PO₄, (0,7) MgSO₄ 7H₂O, (0,5) NaCl, (0,5) KCl, (0,13) Extrait de levure, (15) agar.

Après 5 jours d'incubation à 30°C, la production de chitinase se traduit par l'apparition de zones claires autour des colonies. Les diamètres des zones d'hydrolyse sont mesurés pour chaque isolat (Kopečný et al., 1996).

3.3.2. Protéase

La recherche de l'activité protéolytique chez les isolas étudiés est effectuée sur un milieu de culture spécifique composé en g/l de : (5) caséine pancréatique, (2,5) Extrait de levure, (1) glucose, (15) Agar. En parallèle, 100ml du lait écrémé à 10% est ajoutée au milieu. Les boîtesensemencées sont ensuite incubées à 30°C/48h. La formation d'un halo transparent autour des isolats, indique la présence d'une activité protéolytique (Bach et Munch, 2000).

3.3.3. Cellulase

La mise en évidence de l'activité cellulase est effectuée sur un milieu de culture contenant en g/l : (6) Na₂HPO₄, (3) KH₂PO₄, (1) NH₄Cl, (3) Extrait de levure, (5) CMC, (15) Agar (Carder, 1986). Les boîtes sont incubées à 30°C pendant 7 jours. Afin de révéler la présence d'une cellulase les boîtes sont inondées par une solution de Rouge de Congo (1%) et incubées pendant 20 min, puis une solution de NaCl à 1M est ajoutée. Après une nuit, l'activité cellulase se manifeste par l'apparition d'une zone orange autour des colonies.

3.4. Production de composés volatiles (COVs)

Le protocole suivi pour la réalisation de ce test, consiste à déposer un disque de 5mm de diamètre de l'espèce fongique concernée (*Aspergillus niger*) âgée de 3 jours au centre d'une boîte de pétri contenant le milieu PDA, par la suite les isolats bactériens (F3 et E5) sontensemencés par la méthode des stries sur une seconde boîte contenant le milieu PCA. Les deux boîtes sont par la suite superposées et les deux fonds sont scellés par du parafilm afin d'éviter toute déperdition des substances volatiles (fig. 7). Des boîtes ne contenant que le disque de champignon sont préparées en parallèle comme témoin. L'ensemble des boîtes sont incubées à 25°C pendant 5 à 7J (Fiddaman, 1993).

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).

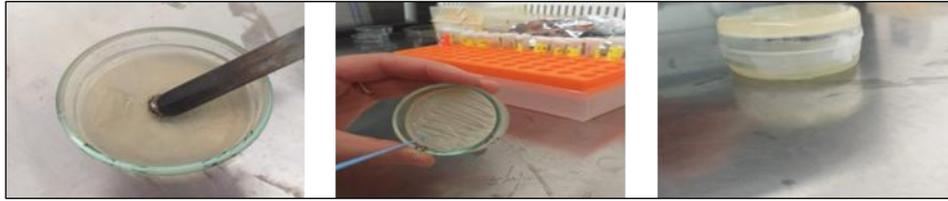


Figure 7: Les étapes suivies pour la mise en évidence de la production des COV's

4. Production de l'acide indole acétique (AIA)

L'analyse quantitative de la production de l'AIA réalisée suivant la méthode de Loper et Scroth (1986). Les isolats sont ensemencés dans des tubes contenant le milieu LB (Annexe II) additionné de 0,5 mg /l de tryptophane et 0,5 % de glucose. Les cultures sont incubées sous agitation à 28°C pendant 48h, après incubation les cultures sont centrifugées à 10000 rpm/10min. Dans des tubes propres, 1 ml de surnageant de chaque culture sont mélangés avec 2 ml de réactif Salkowski puis incubés à l'obscurité pendant 20 minutes. La production de l'AIA se traduit par l'apparition d'une couleur rose.

La quantification de l'AIA produite s'effectue par la mesure de la densité optique à une longueur d'onde de 530nm et les concentrations de l'AIA sont par la suite calculées à l'aide d'une courbe d'étalonnage (annexe III).

Les résultats des activités précédentes ont permis de sélectionner 2 isolats bactériens. Ces derniers ont été soumis aux tests *in vivo* :

- Effet sur la stimulation de la croissance De Maïs ;
- Contrôle de développement d'*Aspergillus niger* sur le Maïs ;
- Contrôle de développement d'*Aspergillus niger* sur les pommes.

5. Effet de l'inoculation bactérienne sur la croissance de Maïs et l'inhibition de développement d'*Aspergillus niger*

L'objectif du test *in vivo* est la vérification des performances des isolats qui ont montré une meilleure activité antagoniste contre les champignons phytopathogènes étudiés.

5.1. Désinfection et germination des grains de Maïs

Les graines sont plongées dans une solution d'hypochlorite de sodium à 5% puis rincées avec de l'eau stérile jusqu'à élimination des traces d'hypochlorite (Omer et al., 2006). Les

graines sont par la suite trempées dans l'eau stérile pendant 2 heures puis transférées dans des boîtes en verre contenant du papier absorbant pasteuriser et humecté avec de l'eau physiologique stérile. Les graines sont déposées à raison de 9 graines par boîtes (fig. 8).

Les boîtes sont enveloppées par du papier aluminium dans le but de créer un milieu favorable pour la germination des graines à 25°C.



Figure 8 : Les étapes de désinfection et de germination des graines du Maïs

5.2. Préparation de la culture bactérienne et fongique

Une culture jeune des isolats sélectionnés est préparée sur milieu PCA. Les suspensions bactériennes utilisées pour l'inoculation des graines du Maïs sont préparées dans l'eau physiologique et la DO est ajusté à 0.1.

La suspension sporale (10^7 spore/ml) est préparée dans l'eau physiologique, à partir s'une culture fongique âgée de 7 jours.

5.3. Inoculation et semis des graines de Maïs

Après germination, les gaines sont semées dans des pots en plastique (5cm de diamètre et 7cm de hauteur) contenant 145g d'un mélange composé de 2/3 de sol et 1/3 de sable. Les graines sont semées à raison de 3 graines par pot à une profondeur de 1cm de la surface (fig. 7). Les graines sont traitées par 1ml de la suspension bactérienne à la base de la tige pour chaque pot. Les plantes sont infectées après 24h par 1ml de la suspension sporale d'*Aspergillus niger* (10^5 spor/ml). Les témoins sont préparés en parallèle et chaque expérience est réalisée en quintuplicata (Omer et al., 2006).

Les semis en pots sont maintenus dans les mêmes conditions à une température de 16-30°C pendant 15 jours. Deux expériences ont été alors réalisées : la première vise à tester le pouvoir antagoniste des isolats bactérien, et la deuxième comprend le test de la stimulation de la croissance.

Les pots sont divisés en 4 lots :

Le 1^{er} lot : Témoin, plantules arrosées avec de l'eau de robinet (15ml / pot) ;

Le 2^{ème} lot : Témoin positif, plantules infectées (*Aspergillus niger*) et arrosées avec de l'eau de robinet (15ml / pot) ;

Le 3^{ème} lot : Test de contrôle de développement d'*Aspergillus niger*, plantules infectées et traitées avec la suspension bactérienne puis arrosées avec de l'eau de robinet (15ml / pot) ;

Le 4^{ème} lot : Test de stimulation, plantules traitées avec la suspension bactérienne puis arrosées avec de l'eau de robinet (15ml / pot).

6. Test d'antagonisme des isolats sélectionnés à l'égard d'*Aspergillus niger* sur fruits de pomme

L'isolat ayant montré une bonne activité antagoniste à l'égard d'*Aspergillus niger*, et une variété de pomme (Golden Delicious variety) sont utilisés dans cette expérience. Le test est réalisé comme suit :

- Sélectionner les pommes qui n'ont pas d'anomalies.
- La désinfection des pommes sélectionnées avec une immersion pendant 1 à 2 min dans une solution à 2% d'hypocrolite de sodium, suivie d'un lavage avec l'eau distillé stérile ensuite sécher a l'air ambiant pendant 2 heure
- Réalisation des puits dans la zone équatoriale de la pomme (3mm largeur x 3mm de profondeur) afin de pouvoir inoculer les suspensions sporale et bactériennes.
- Inoculation de 30 µl de la suspension bactérienne dans chaque puits et 30µl de l'eau physiologique pour le témoin, après 2 heure ajout de 15 µl de la suspension fongique.
- Transfert des pommes traitées dans des boites stériles contenant du papier absorbant humecté avec l'eau distillé stérile (2 pommes par boite)
- Incubation à 20°C pendant 4 à 7 jours

➤ Le test est réalisé en duplicata

Les différents traitements :

Témoin 1 : inoculation avec 30 μ l d'eau physiologique stérile

Témoin 2 : inoculation avec 30 μ l de la suspension bactérienne

Témoin 3 : inoculation avec 15 μ l de la suspension fongique

Teste 1 : inoculation avec 30 μ l de la suspension bactérienne puis ajout 15 μ l de la suspension fongique

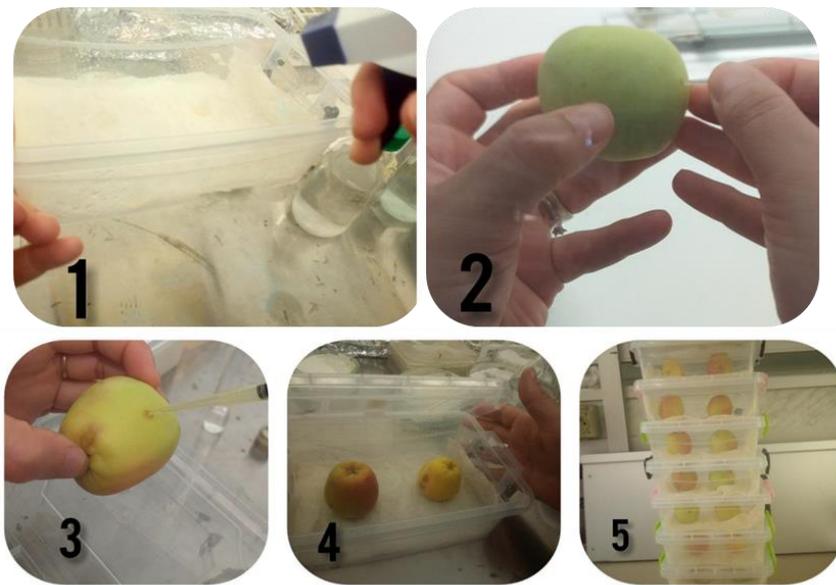


Figure 9 : Les différentes étapes suivies dans le test *in vivo* sur les pommes

1-Préparation des boites /2- Réalisation des puits /3- Inoculation des suspensions /4-Transfert des pommes dans les boites /5- incubation.

Résultats et discussion

1. Isolement de bactéries rhizosphériques

Suite aux études et expériences réalisées dans le domaine de la recherche de nouveaux moyens de protection et de lutte contre les agents phytopathogènes, le biocontrôle s'est avéré d'un grand intérêt industriel et agronomique, d'où une nouvelle approche biologique a été créée dans le but de l'exploiter dans la protection et l'amélioration de la qualité des cultures.

Dans cette présente étude, la zone rhizosphérique est choisie comme lieu de prélèvement, car c'est le lieu d'interaction entre le sol, la plante et les microorganismes. En raison de nombre des interactions, des échanges et de compétition qui existent dans cette zone, la probabilité d'isolement de bactéries dotées de propriétés caractérisant les agents de biocontrôle est importante. Les isolats obtenus à partir des échantillons rhizosphériques sont isolés sur le milieu PCA. La purification des bactéries a permis d'obtenir une diversité de colonies différentes en terme d'aspect, de couleur, de taille et de forme, d'où un ensemble de 11 isolats bactériens sont sélectionnés pour les tests de contrôle de quatre champignons phytopathogènes *in vitro* et *in vivo*.

2. Mise en évidence de l'activité antifongique des isolats

L'activité antifongique des isolats obtenus à l'égard des champignons testés dans la présente étude est évaluée par mesure des pourcentages d'inhibition de la croissance (PGI%).

La méthode suivie dans cette partie est la méthode de confrontation sur gélose, qui est une technique qui permet d'avoir un aperçu préliminaire sur l'aptitude d'un isolat à inhiber la croissance fongique. Les effets des isolats contre les différentes espèces fongiques sont présentés dans les figures ci-dessous.

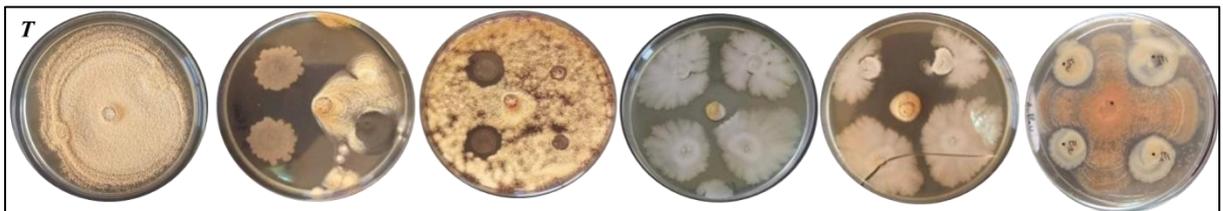


Figure 10 : Activité antifongique de quelques isolats sur *A. flavipes*

T : Témoin

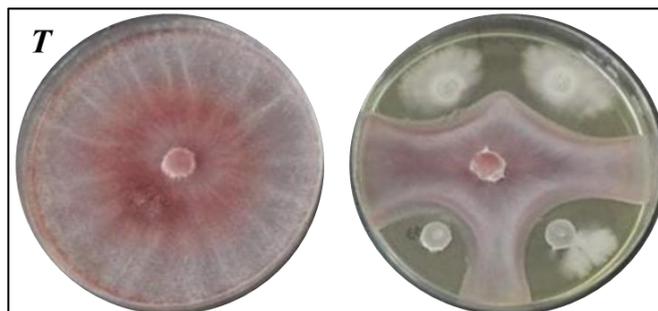


Figure 11 : Activité antifongique des isolats F3.1 et F3.2 sur *Fusarium* sp.

T : Témoin



Figure 12 : Activité antifongique des isolats E5, F3.1 et F3.2 sur *A. niger*

T : Témoin



Figure 13 : Activité antifongique des isolats E5, F3.1 et F3.2 sur *Penicillium* sp.

T : Témoin

Après 7 jours d'incubation, les 11 isolats obtenus ont montré une action inhibitrice envers les quatre champignons testés (*A. niger*, *A. flavipes*, *Penicillium* sp., et *Fusarium* sp.) avec des pourcentages d'inhibition (PGI%) qui varient selon les isolats et les champignons testés. Les résultats des PGI% obtenus lors du test *in vitro* sont présentés dans les graphes ci-dessous.

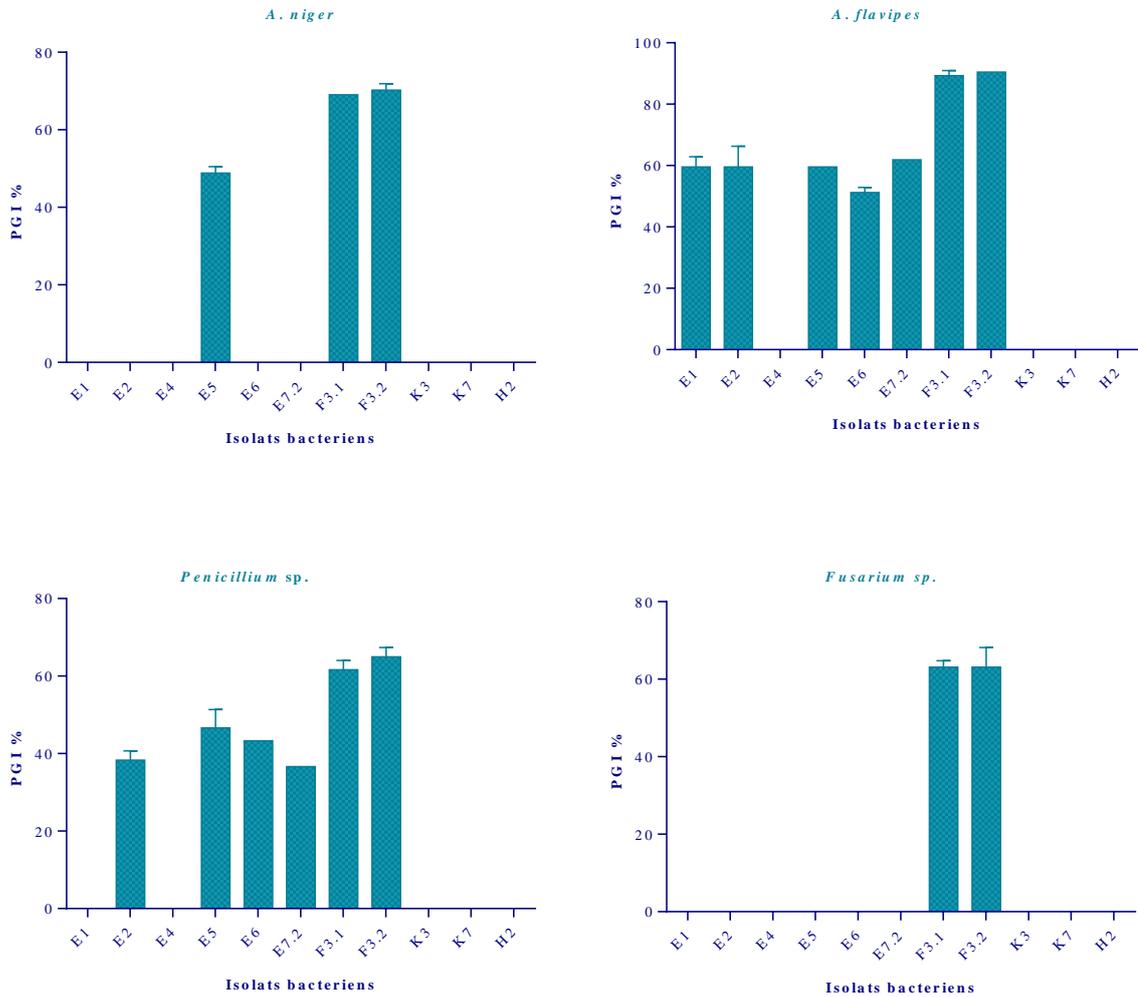


Figure 14: Pourcentage d’inhibition de la croissance des champignons phytopathogènes par les isolats bactériens

Les résultats obtenus ont montré que la plupart des isolats obtenus présentent un effet antagoniste *vis-à-vis* les champignons phytopathogènes testés, qui se traduit par une réduction de leur croissance par rapport au témoin (fig. 14). D’après les PGI% calculés, les valeurs d’inhibitions les plus importantes sont enregistrés chez les 3 isolats F_{3.1}, F_{3.2} et E₅ contre la plupart des champignons.

Les isolats F_{3.1} et F_{3.2} ont montrés une forte activité contre *Aspergillus flavipes* avec un PGI% >88% , suivie de *Aspergillus niger* où le pourcentage d’inhibition de la croissance par F_{3.1} est de 69,04% , et pour l’isolat F_{3.2} il est de 71,41% .

Pour les deux champignons *Fusarium* sp. et *Penicillium* sp., les PGI% calculés avec l'isolat F_{3.1} sont : 60% et 64% , et ceux obtenus avec l'isolat F_{3.2} sont : 59 ,52% et 66 ,66% respectivement.

Une inhibition moyenne de croissance mycélienne des trois champignons *A. Niger*, *A. flavipes* et *Penicillium* sp. est obtenue avec l'isolat E₅, PGI% > 43%, en revanche, cet isolat ne présente aucune activité antagoniste contre *Fusarium* sp.

Les isolats E₂, E₆ et E_{7.2} ont montré une activité inhibitrice uniquement contre *A. flavipes* et *Penicillium* sp avec des PGI% de *A. flavipes* de 54,76%, 52,38% et 61,90 % respectivement. Et pour le champignon *penicillium* sp., les pourcentage d'inhibition sont : 40%, 36,66% et 43,33% respectivement. Une activité spécifique contre *A. flavipes* est obtenue avec l'isolat E₁ avec un PGI% de 61,90%.

D'après les résultats obtenus, *A. flavipes* est le champignon le plus sensible, suivis de *Penicillium* sp. Les expériences *in vitro*, ont montré que parmi les 11 isolats, 81% des isolats présentent au moins une activité antagoniste à l'égard d'un des champignons cibles avec des PGI% > 36%. L'action antagoniste des isolats ne semble pas être spécifique de l'agent pathogène, elle peut être dans certains cas à large spectre, agissent au même temps sur les cinq champignons. Les trois isolats F_{3.1}, F_{3.2} et E₄ semble être les isolats les plus performants en raison de leur capacité à inhiber la croissance mycélienne des champignons testés avec des taux d'inhibition variables. La différence d'intensité du pouvoir inhibiteur de ces isolats pourrait être liée à la nature et la quantité de substances produites par la bactérie antagoniste, comme elle pourrait être liée aux conditions de production des métabolites antifongiques (composition de milieu de culture, pH, température d'incubation, temps d'incubation). Das et al, (2015) ont rapporté dans leur étude, que des isolats bactériens ont inhibé la croissance des trois champignons *A. niger* *A. flavipes* et *Fusarium* sp., et que cette inhibition est le résultat de la production de substances antifongiques dans le milieu de culture.

Les rhizobactéries sont connues par leur effet antagoniste comme agents de biocontrôle, de type PGPR qui représentent le groupe de bactéries rhizosphériques promotrice de la croissance des plantes. Elles sont caractérisées par leur pouvoir antifongique exprimé par la production de métabolites antifongique et une activité stimulatrice de la croissance des plantes qui est assurée par la sécrétion des sidérophores, la production de phytohormone, la fertilisation du sol, etc.

La lutte biologique contre les champignons phyto-pathogènes est un moyen de lutte naturel qui utilise des microorganismes antagonistes isolés de l'environnement naturel dans lequel

ils entrent en compétition avec des microorganismes pathogènes (Grzegorzcyk et al, 2017 ; Tontou et al, 2016). Il a été rapportés que les isolats rhizosphériques tels que les PGPR sont des agents de biocontrol potentiels, grâce à leur habilité à produire des molécules antibiotiques, des COV's, des enzymes hydrolytiques dégradant la paroi cellulaire fongique tel que les chitinase, protéinase, cellulase, et d'autres molécules bioactives (Adesina et al, 2007). Ces agents impliquent également d'autres mécanismes pour contrôler les organismes phytopathogène, comme la compétition (pour l'espace et pour les nutriments) la modification des caractéristiques du sol, etc.

3. Recherche de métabolites spécifiques à activités antifongiques

Une série de tests ont été effectués durant cette investigation, afin de rechercher et déterminer les mécanismes d'activité probables, de nos isolats contre les champignons phytopathogènes.

3.1. Production de NH₃ et de l'HCN

Les résultats de la production d'HCN et d'NH₃ sont présentés dans le tableau suivant.

Tableau II : Résultats des tests de production de métabolites antifongiques

Isolats	Production d'NH₃	Production d'HCN
E₁	++	-
E₂	++	-
E₄	+++	-
E₅	+	-
E₆	+	-
E_{7.2}	++	-
F_{3.1}	+	-
F_{3.2}	+	-
K₃	+	-
K₇	+	-
H₂	-	-

(+) : Faible production ; (++) : Production moyenne ; (+++) : Forte production ; (-) : Aucune production

La production quantitative de l'ammoniac est réalisée dans l'eau peptonée, après l'incubation et l'ajout du réactif de Nessler, la couleur de milieu inoculé a viré au jaune

foncé indiquant la présence de l'ammoniac dans le milieu (figure 15). La totalité des isolats ont produits l'ammoniac, à l'exception de l'isolat H₂.

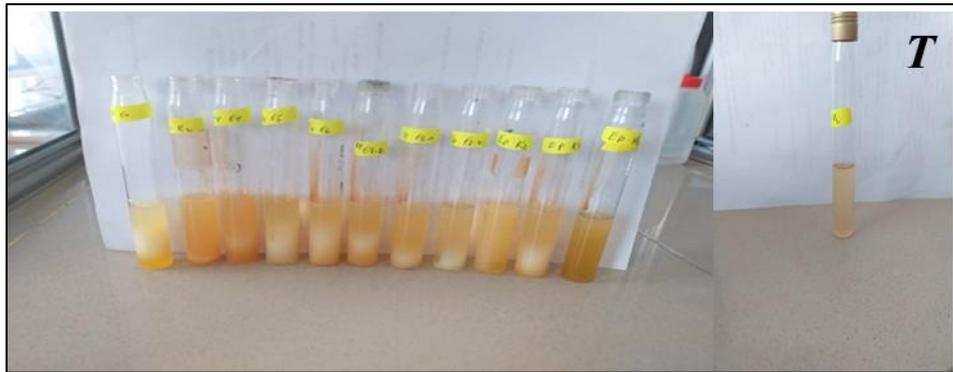


Figure 15 : Résultats de test de production de l'ammoniac comparés au témoin négatif (T)

Plusieurs auteurs, ont rapporté dans leurs études que la production d'ammoniac est l'un des mécanismes impliqués par les bactéries rhizosphériques pour lutter contre les organismes phytopathogènes. (Joseph et al., 2007 ; Ahmed et al., 2008). C'est une molécule clé utilisée dans la signalisation lors de l'interaction entre les plantes et les rhizobactéries (Becker et al., 2002). Chang and chang, (1999) dans une étude menée dans un sol acide en présence d'urée, ont trouvé que suite à l'activité bactérienne, le taux de NH₃ dans le sol a augmenté considérablement. Setua et Samanddar, (1980), suggèrent que la production de l'ammoniac par les bactéries augmente le pH du sol ce qui constitue une condition défavorable pour les champignons. La croissance de ces derniers est inhibée complètement suite à ce stress.

Le cyanure d'hydrogène est un autre métabolite antifongique impliqué dans la lutte contre les phytopathogènes. Le virage de la couleur de papier Whatman du jaune vers l'orange ou le marron indique la production d'HCN. Durant cette étude, aucun isolat n'a produit l'HCN (fig. 16).



Figure 16 : Résultats de la production d'HCN

Les rhizobactéries sont connues pour leur capacité à produire des métabolites bénéfiques pour la croissance et la santé des plantes, l'HCN par sa toxicité, il est classé parmi les métabolites impliqués dans la protection des cultures. La production de l'HCN est une activité commune des espèces bactérienne appartenant aux genres *Pseudomonas* et *Bacillus* (Kachhap et al., 2015.) L'HCN est défini comme un métabolite de biocontrôle impliqué dans la protection de nombreuses plantes contre les maladies causées par les champignons phytopathogènes (Ramette et al., 2003 ; Jousset et al., 2006). D'autres auteurs ont rapporté que l'HCN peut avoir un autre rôle qui est l'augmentation de la disponibilité des nutriments dans le sol, par la séquestration des minéraux comme le phosphate (Rijavec et Lapanje, 2016).

3.2. Production d'enzymes

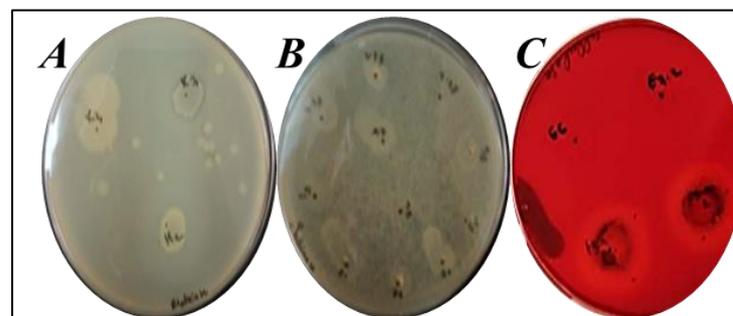
La production d'enzymes (chitinase, cellulase, protéase) est recherchée chez 11 isolats bactériens (E₁/E₂/E₄/E₅/E₆/E_{7.2}/F_{3.1}/F_{3.2}/K₃/K₇/H₂), les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau ci-dessous.

Tableau III: Résultats des différents tests de d'activités enzymatiques

Isolats	Chitinase	Cellulase	Protéase
E ₁	-	-	+
E ₂	-	-	+
E ₄	-	++++	+
E ₅	-	-	+
E ₆	-	-	+
E _{7.2}	-	-	++
F _{3.1}	-	++	-
F _{3.2}	-	+++	-
K ₃	+	+++	-
K ₇	-	+++	++
H ₂	-	-	-

(+) : Faible activité; (++) : Activité moyenne; (+++) : Forte activité; (-) : Absence d'activité

D'après le tableau, on note qu'un seul isolat (K₃) uniquement, produit la chitinase, concernant les deux autres enzymes, 5 isolats (E₄, F_{3.1}, F_{3.2}, K₃, K₇) produisent la cellulase et 7 isolats (E₁, E₂, E₄, E₅, E₆, E_{7.2}, K₇) produisent la protéase (fig. 17).



Figures 17 : Aspect des résultats positif des activités enzymatiques de quelques isolats

A : Protéase ; B : Chitinase ; C : Cellulase

La production d'une enzyme par les micro-organismes est déterminée en compte tenu de sa capacité à décomposer un substrat et à changer la couleur du milieu du culture spécifique autour des colonies (Khanh et al, 2020).

Di Francesco et al, (2015), ont montré que la capacité des bactéries à produire des enzymes hydrolytiques peut jouer un rôle important dans l'activité antagoniste, d'après une

expérience réalisée par Khanh et al, (2020) sur des bactérie appartenant au genre *Bacillus* et ayant montré une activité antagoniste à l'égard de *Phytophthora Infestans* agent de mildiou chez la tomate, la souche *Bacillus velezensis* s'est avérée capable de produire plusieurs enzymes, dont la chitinase, la cellulase et la protéase et elle a inhibé 88,89% de la croissance mycélienne de *Phytophthora Infestans*. Les enzymes produites par cette souche contribuent à la dégradation de la paroi cellulaire du champignon.

Dans cette étude, seul l'isolat K3 a produit la chitinase, les autres semblent avoir d'autres mécanismes pour contrôler la croissance des champignons. Les chitinases ont été décrite comme des enzymes ayant la capacité de dégrader la chitine, les micro-organismes qui produisent cette enzyme jouent un rôle majeur dans la lutte contre les champignons phytopathogènes dont leur paroi cellulaire contient de la chitine (Ayantola et al, 2020).

Martínez-Absalón et al, (2014) ont rapporté que la souche *Bacillus thuringiensis* UM96 productrice de chitinase, a pu inhiber la croissance de *Botrytis cinerea*. Dans une autre expérience, les même auteurs ont trouvé que la production de la chitinase participe potentiellement dans la lutte contre les espèces fongiques. Velusamy et Kim (2011) ont révélé que la souche KB3 qui a produit plus de chitinase, a inhibé la croissance de *Rhizoctonia solani*. La souche pathogène de *B. cinerea* a montré une sensibilité à la chitinase pure de *Streptomyces griseus* (Martínez-Absalón et al, 2014).

Les bactéries utilisent la cellulase pour décomposer la cellulose de la paroi cellulaire des champignons phytopathogène. Dans le domaine De l'agriculture, les cellulases secrétées par certains *Bacillus* spp., ont été décrite comme une caractéristique favorisant la croissance des plantes (Ajigbola et al, 2013). Dans notre étude, environ 50% des isolats ont produit la cellulase. D'après certain auteurs, le gram peut avoir un lien avec la production de la cellulase, selon Schwarz (2001), environ 80% des bactéries cellulolytiques isolées sont des Gram positives. Ahemad et al., (2014) et Reetha et al. (2014) quant à eux, ils ont mis le point sur les genres qui produisent plus la cellulase, selon ces auteurs la plupart des espèces produisant la cellulase appartiennent aux genres *Bacillus* et *Pseudomonas*.

Concernant l'activité protéolytiques, 63% des isolats produisent la protéase. Les protéases jouent un rôle majeur dans les processus de la lyse cellulaire, cette enzyme se lie à la couche externe de mannoprotéines de la paroi cellulaire, ouvrent la structure de la protéine et exposent les couches internes de glucane et les microfibrilles de la chitine (Han et al, 2015). La production des protéases par *bacillus* spp. a été rapportée par Fergus et al,

(1977), cette enzyme est sécrétée par les bactéries pour lutter contre les champignons phytopathogènes. L'importance de la protéase dans le bio-contrôle a été montrée en absence d'autres enzymes comme la chitinase et la lipase. Cela signifie qu'une bactérie produisant suffisamment de protéase peut contrôler la croissance des phytopathogènes, sans avoir besoin de produire d'autres enzymes (Athman et al, 2006; Ayantola et al, 2020). La protéase est très importante non seulement dans l'industrie mais aussi dans les pratiques agricole, elle contribue à la fertilité du sol et améliore la croissance des plantes (Athman et al, 2006).

3.3. Production de composés volatiles (COVs)

La production des substances antifongiques volatiles est réalisée par la culture des bactéries et des champignons sur des boîtes séparées pour éviter le contact entre les deux géloses, ce qui empêche la diffusion de substances dans le milieu de culture. Seule une substance volatile produite par la bactérie pourra donc provoquer une inhibition de la croissance du champignon.

Les isolats testés dans ce travail ne semblent pas inhiber la croissance des champignons par la production des composés volatiles. L'activité antagoniste de nos isolats est liée à la production des autres métabolites ou l'utilisation d'autres mécanismes de lutte, tels que la production des enzymes hydrolytiques (protéases, cellulases, chitinase), production de cyanure d'hydrogène, ainsi que l' NH_3 .

L'activité antifongique des COV's est détectée d'après Rojas-Solís et al, (2018) chez le genre *pseudomonas*, la souche *Pseudomonas stutzeri* a été sélectionnée pour son excellente activité antagoniste contre *botrytis cinerea* par production de composés organiques volatiles (COV). Plusieurs auteurs ont étudié l'effet des molécules volatiles (HCN, NH_3 , 2,3-butanediol, l'acétoïne, etc.) produites par les bactéries sur l'amélioration de la croissance des plantes et leur rôle dans l'induction de la résistance de ces dernières contre certaines maladies (Ryu et al, 2003 ; Charest et al., 2005; Wani et al., 2007 ; Ahmad et al., 2008). Huang et al, (2012) ont rapporté que le composé volatil diméthyle disulfide (DMDS), produit par des bactéries appartenant au genre *Bacillus*, stimule la résistance systémique induit (ISR) des plantes, en particulier le maïs. Ce composé a permis de protéger les plantes contre *Botrytis cinerea*.

3.4. Production d'AIA

La recherche de la production d'AIA est effectuée sur milieu LB additionné du tryptophane et du glucose. La production de l'AIA par un isolat est traduite par l'apparition de la couleur rose (fig. 18). Les valeurs de l'AIA produite par les isolats sont présentées dans la figure 19.

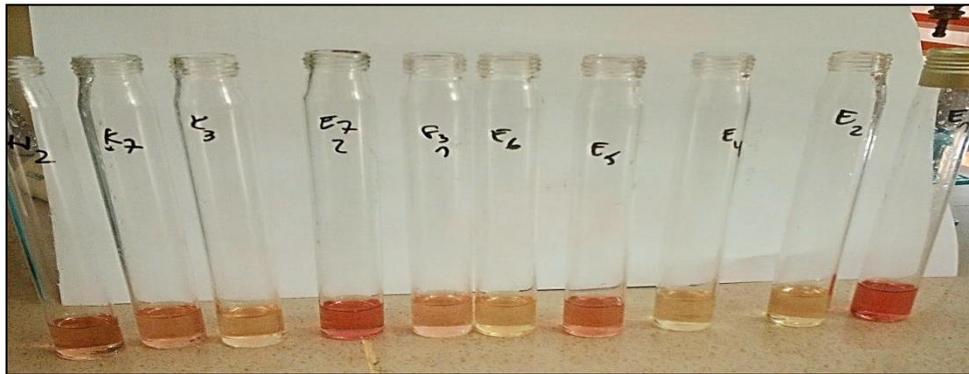


Figure 18 : Aspect des résultats positifs de la production d'AIA

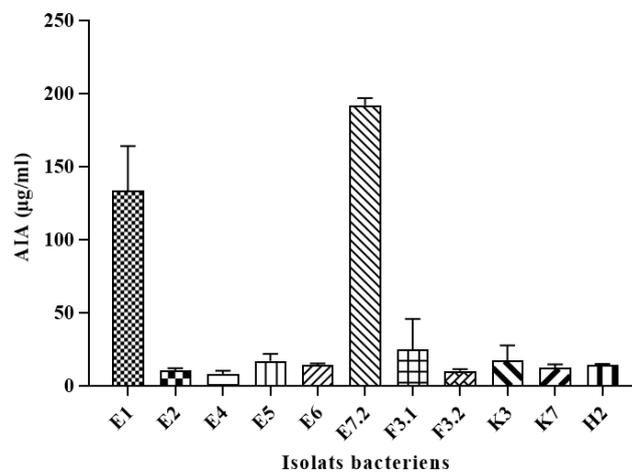


Figure 19 : Les différentes concentrations d'AIA produites par les isolats bactériens

Les phytohormones sont des substances organiques indispensables pour réguler la croissance et le rendement des plantes et jouent un rôle également majeur dans l'induction de la tolérance des plantes à divers stress biotiques et abiotiques.

D'après les résultats obtenus, tous les isolats testés produisent l'AIA à des concentrations variables. La production maximale de l'AIA [192 µg/ml] est obtenus avec l'isolat E7.2, suivi de l'isolat E1 [133µg/ml]. Les autres isolats montrent des productions comprise entre 8 µg/ml et 25 µg/ml.

La concentration de l'AIA varie en fonction des souches bactériennes, généralement le genre *pseudomonas* produit plus d'AIA par rapport aux autres genres bactériens (Bharucha et al, 2013). Des concentrations proches à celle obtenus avec les deux isolats E_{7.2} et E₁, ont été obtenus dans le travail effectué par Ahmad et al, (2008), sur l'optimisation de la production d'acide indole acétique. Ils ont rapporté que les souches appartenant au genre *pseudomonas* ont produit la meilleur quantité d'AIA avec une concentration >100µg/ml.

Contrairement à ce qui est connu auparavant, le taux de production élevé d'AIA n'est pas toujours bon pour la plante. Plusieurs études ont permis de confirmé cette théorie. D'après Beneduzi et Passaglia (2011), les souches produisant des quantités faibles d'AIA, stimulent la croissance des plantes, alors que celles qui produisent de fortes concentrations peuvent inhiber le développement des racines. Dans une autre étude, Egamberdieva (2009), a montré que la croissance racinaire du blé inoculé par trois souches de *Pseudomonas* productrices de l'AIA (5, 5.7 et 7.4 µg/ml) s'est amélioré avec un taux de 52%. Ces taux sont proches de ceux obtenus avec nos trois isolats E₂, E₄ et F_{3.2} qui ont produit des taux de (10,55 ; 8 et 10 µg/ml) respectivement, ce qui approuve leur utilisation comme inocula à des semences afin d'améliorer la croissance et le rendement des plantes.

4. Effet de l'inoculation bacterienne sur la croissance de Maïs et l'inhibition de développement d'*Aspergillus niger*

Dans ce travail, le test est effectué sur le maïs. le champignons choisis est *Aspergillus niger* et l'isolats bactérien sélectionné et F_{3.1}. Ces choix sont basés sur les résultats trouvés lors des tests *in vitro*.

A cause des conditions environnementales dans lesquelles le test est réalisé, le champignon n'a pas pu infecter les cultures de maïs. De ce fait l'activité antagoniste de l'isolat F_{3.1} n'a pas pu être vérifiée.

Le pouvoir des bactéries rhizosphériques à contrôler les champignons phytopathogène *in vivo*, a été rapporté par plusieurs auteurs. Jha et al, (2019), dans une étude sur l'effet de deux isolats associées aux racines: *Bacillus megaterium* (bactérie rhizosphérique) et *Pseudomonas aeruginosa* (bactérie endophyte) dans le bio-contrôle d'*Aspergillus niger* sur le maïs, ont montré que ces deux souches utilisés comme agents de bio-contrôle ont réduit l'incidence de la maladie sous serre et que les souches rhizosphériques étaient plus active que les souches endophytes. Hotterbeekx et al., (2017), ont établi une relation direct chez

le radis, entre l'antagonisme *in vitro* et la réduction de la maladie par *Pseudomonas in vivo*. L'analyse des résultats du test de bio-contrôle, a montré que la réduction de la maladie *in vivo* était directement proportionnelle à l'inhibition de la croissance mycélienne *in vitro*.

Les champignons sont à l'origine de plusieurs maladies chez le maïs (Owolade et al. 2005). Plusieurs espèces d'*Aspergillus* peuvent infecter le maïs et provoquer la pourriture de l'épi, *A. niger* produit des masses de spores noires et poudreuses qui recouvrent à la fois les graines et les épis (Cimmyt et al, 2004; Somda et al. 2008). Le flétrissement et le retard de croissance sont associés à la pourriture de l'épi causée par *A. niger* (Cimmyt et al, 2004).

Les conditions favorables pour que *A. niger* affecte le maïs sont : la sécheresse (absence de pluie), températures élevées (26 °C à 38 °C) et humidité relative élevée (85 %) et pendant la pollinisation et le remplissage du grain : concernant les conditions favorables à l'apparition de la moisissure : les conditions sèches et les températures élevées (26 à 28 °C) (RAP, 2014).

5. Test d'antagonisme des isolats sélectionnés à l'égard d'*Aspergillus niger* sur fruits de pomme

Les infections post récolte des fruits récoltés entraînent des pertes économiques considérables, il est difficile d'estimer les pertes dues à chaque agent pathogène causal de ces infections, car les blessures sont colonisées parfois par plusieurs espèces fongiques (Attrassi et al, 2005).

La pomme (*malus pumila mill*) est une culture nutritionnelle importante, elle est principalement consommée sous son état frais (Madboulya et al, 2020).

Les pommes sont récoltées en début de maturation pour maximiser la durée de conservation et la période de mise en marché, toutefois une conservation prolongée des pommes les expose à de plusieurs agressions qui peuvent être d'origine physiques, ou d'origines parasitaires et fongiques (Deell et al, 2003).

Dans le but de vérifier la possibilité d'utiliser nos isolats bactériens dans le biocontrôle d'*Aspergillus niger*, l'agent causal de la pourriture des pommes, l'isolat F_{3.1} est sélectionné suite aux résultats obtenus dans les tests *in vitro* (inhibition de la croissance mycélienne, et production de métabolites impliqués dans la lutte biologique).

Après 6 jours d'incubation des fruits de pomme à 25°C dans des boîtes humidifiées, les endroits inoculés avec uniquement les spores fongiques (control) ont montré un stade

plus avancé de l'infection (beaucoup de mycélium et de spores dans les trous) par rapports aux fruits traités. Les résultats obtenus sont montrés dans les figures ci-dessous.

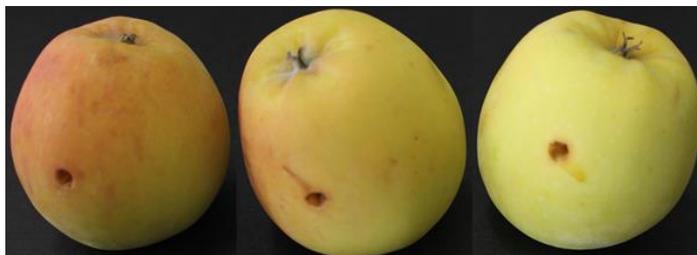


Figure 20: Aspect des pommes témoins (eau physiologique)



Figure 21 : Aspect des pommes traitées par l'isolat F_{3.1}



Figure 22 : Aspect des pommes infectées par l'agent phytopathogène (*A. niger*)



Figure 23 : Aspect des pommes infectées par l'agent phytopathogène (*A. niger*) et traitées par l'isolat F_{3.1}

D'après les résultats, L'isolat F_{3.1} appliqué seul n'a montré aucune altération sur les pommes ce qui indique que l'isolat testé ne représente aucune pathogénicité sur le fruit.

Contrairement à l'agent pathogène *A. niger*, qui a manifesté sa pathogénicité par des zones de pourriture rempli de spores. Une co-inoculation des pommes avec le champignon suivie de l'isolat F_{3.1} est effectuée pour déterminer et évaluer l'activité inhibitrice de cet isolat à l'égard de *A. Niger* notamment la détermination de la sensibilité du champignon à l'isolat F₃ *in vivo*.

Chez les pommes traitées auparavant par l'isolat F_{3.1} puis infectées par l'agent pathogène, l'isolat F_{3.1} semble avoir un effet antagoniste très intéressant, en inhibant la croissance de presque la totalité de l'agent phytopathogène.

L'application des bactéries dans le biocontrôle des champignons phytopathogènes *in vivo* a été rapporté par plusieurs auteurs (Bensidhoum et al., 2015 ; Fan et al, 2017 ; Rai, 2017 ; Tabli et al., 2018).

Dans une étude similaire à notre étude sur l'effet antagoniste de *Bacillus* contre la pourriture des pommes, Fan et al, (2017) ont rapporté que cet souche a également contrôler efficacement l'agent pathogène *A. niger*. Rai (2017) a montré que L'antagoniste *P. protegens*-RhiNA a exprimé une forte activité inhibitrice vis-à-vis développement de *B. cinerea* sur les fruits de pomme. López-González et al, (2021) ont montré que les deux souches *Bacillus* spp. Q11 et *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* M24, ont inhibé complètement la croissance de *Penicillium expansum* sur les fruits de pomme (Golden Delicious variety).

Le potentiel antagoniste de l'isolat F_{3.1}, pourrait être attribué à la compétitivité de ce dernier, sur les nutriments et l'habitat par rapport à l'agent pathogène. D'autres mécanismes peuvent également être à l'origine de cette activité comme la production d'enzymes hydrolytiques qui entraînent la réduction de la croissance fongique, comme il a été rapporté par Sharma et al, 2009). La production de fengycine, un lipopeptide bioactif produit par le genre *Bacillus*, est un autre mécanisme impliqué dans le contrôle des champignons filamenteux (Deleu et al, 2005). D'après Fan et al (2017), la fengycine produite par *Bacillus* joue un rôle majeur dans l'inhibition du développement du champignon phytopathogène *Botryosphaeria dothidea*.

Conclusion générale

Conclusion

L'utilisation des microorganismes dans la lutte contre les agents phytopathogènes est une approche biologique considérée ces dernières années comme une alternative prometteuse à l'utilisation excessive des produits agrochimiques.

Le présent travail rentre dans le cadre de la recherche et de la sélection d'un ensemble d'agents biologiques potentiels en vue de leur utilisation dans le domaine agricole.

L'activité antifongique montrée par la majorité de nos isolats obtenus dans ce travail (F_{3.1};F_{3.2};E₅;E₂;E₆;E_{7.2};E₁) est remarquable. Les résultats des tests *in vitro* ont montré que 81% des isolats présentent une activité antagoniste à l'égard d'au moins un des champignons testés (*Aspergillus flavipes*, *Aspergillus niger*, *Fusarium* sp. et *Penicillium* sp.), avec des PGI% qui varient entre 36% et 89%.

Les résultats de la production de métabolites à activité antifongiques a montré que la majorité des isolats produisent le NH₃, la protéase et la cellulase, ainsi que l'AIA. La chitinase est produite seulement par l'isolat K3. Concernant le cyanure d'hydrogène, aucun des isolats ne le produit.

Concernant le test visant à vérifier l'effet de l'inoculation bactérienne sur la croissance de Maïs et l'inhibition de développement d'*Aspergillus niger*, l'activité antagoniste de l'isolat F_{3.1} n'a pas pu être vérifiée, à cause des conditions environnementales dans lesquelles le test est réalisé (le champignon n'a pas pu infecter les cultures de maïs).

Les résultats de l'activité antifongique sur les pommes ont montré que l'isolat F_{3.1} *in vivo* présente un effet antagoniste très intéressant, en inhibant la croissance de presque la totalité de l'agent phytopathogène (*Aspergillus niger*).

L'effet antagoniste de ces isolats laisse entrevoir des perspectives d'application dans les domaines de l'agriculture et de l'alimentation.

À l'issue de ce travail, nous émettons quelques réflexions et recommandations sous forme de perspectives pour l'amélioration et une meilleure exploitation des isolats bactériens sélectionnés :

- Etudier l'effet antagoniste des isolats actifs à l'égard d'autres champignons et bactéries phytopathogènes, *in vitro* et *in vivo*.
- Réaliser une identification moléculaire des substances bioactives produites lors de la réaction antagoniste
- Caractériser et identifier les isolats bactériens

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- A**desina MF, Lembke A, Costa R, Speksnijder A, Smalla K, (2007). Screening of bacterial isolates from various European soils for in vitro antagonistic activity towards *Rhizoctonia solani* and *fusarium oxysporum* :site_dependent composition and diversity revealed. Soil biology and Biochemistry. 39:2818_2828.
- Ahemad M, Kibret M, (2014).** Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: current perspective . Journal of King Saud University-Science .26:1-20
- Ahmad F, Ahmad I, Khan MS, (2008).** Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. Microbiological. Research. 163:173–181.
- Aiello D, Restuccia C, Stefani E, Vitale A ,Cirvilersi G, (2019).** Postharvest biocontrol ability of *Pseudomonas synxantha* against *Monilinia fructicola* and *Monilinia fructigena* on stone fruit .Postharvest Biology and Technology.149:83-89
- Ajigbola CF, Babalola OO, (2013).** Integrated management strategies for tomato *Fusarium* wilt. Biocontrol Sciences .18:117-127
- Anonyme1:**http://postharvest.ucdavis.edu/Commodity_Resources/Fact_Sheets/Datastores/Vegetables_French/?uid=1&ds=808 (consulté le 17/08/2021)
- Anonyme 2:** <https://www.invasive.org/browse/detail.cfm?imgnum=5367343> (consulté le 17/08/2021)
- asbl Tournesol-Zonnebloem vzw, (2014).** Moyens de lutte contre les maladies et les ravageurs. Initiation au jardinage biologique – formations grand public – printemps 2014
- Athman YS, (2006).** Host-endophyte-pest interactions of endophytic *Fusarium oxysporum* antagonistic to *Radopholus similis* in banana (*Musa* spp.). PhD Thesis. University of Pretoria. 1-183
- Attrassi K, Selmaoui K, Touhami AO, Badoc A, Douira A, (2005).** Biologie et physiologie des principaux agents fongiques de la pourriture des pommes en conservation et lutte chimique par l'azoxystrobine. Bull. Soc. Pharm. Bordeaux. 144: 47-62.
- Ayantola KJ, Fagbohun ED, (2020).** Enzymatic Activity of Rhizobacillus Isolated from Tomato Rhizosphere. Asian Journal of Biochemistry. Genetics and Molecular Biology.4:11-19

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

Barberchek M , (2011) . Insect-parasitic nematodes for the management of soil-dwelling insects.university Park .PA:Penn State University.College of Agricultural Sciences

Becker D, Stanke R, Fendrik I, Frommer WB, Vaderleyden j, Kaiser WM, Hedrich R, (2002). Expression of the NH₄⁺ transporter gene LEAMT 1;2 inducer in tomato roots upon association with N₂- fixing bacteria. *Planta*.215:424-429.

Beneduzi A. Passaglia LMP, (2011). Genetic and Phenotypic Diversity of Plant Growth Promoting Bacilli In: Mahashwari D.K. (Eds) .*Bacteria in Agrobiolology;plant Growth Responses* Springer-Verlag: Berlin Heidelberg.1-20

Bensidhoum L, Rai A, Tabli N, Kahouadji N , Khaber M , Nabti E, (2015). Biological Control of *Botrytis cineria* by *Bacillus* sp strain S7LiBe under abiotic stress.*International Journal of Scientific Research in Science and Technology* .6:07-14

Bensidhoum L, (2016). Effet des extraits d'algues marines et d'une souche de *Pseudomonas protegens* S5LiBe résistante aux métaux lourds sur la croissance de l'orge et le biocontrôle d'agents phytopathogènes. Thèse de Doctorat, Université Abderrahmane Mira. Bejaia. Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie. Bejaia. 176

Berry JP, Gantar M, Perez MH, Berry G, Noriega FG, (2008) . Cyanobacterial toxins as allelochemicals with potential applications as algacides;herbicides and Insecticides. *Marine Drugs*.6:117–146

Bharucha U, Kamlesh P, Ujjval B, Trivedi, (2013). Optimization of indole acetic acid production by *Pseudomonas putida* UB1 and its effect as plant growth-promoting rhizobacteria on mustard (*Brassica nigra*). *Agric Res.* 2:215_221.

Bloemberg GV, Lugtenberg BJJ, (2001) .Molecular Basis of Plant Growth Promotion and Biocontrol by Rhizobacteria. *Current Opinion in Plant Biology.* 4: 343-350.

Brabandt H, Bauriegel E, Gârber U, Herppich WB, (2014) ΦPSIIand NPQ to evaluate *Bremia lactucae*-infection in susceptible and resistant lettuce cultivars.*Scientia Horticulturae* .180:123–12

Carder JH, (1986). Detection and quantification of cellulase by congo red staining of substrates in a cup-plate diffusion assay. *Anal. Biochem.* 153: 75-79

Cappucino JC, Sherman N, (1992). Negative staining. *Microbiology: A laboratory Manual.* 3 :125-179.

Chang TT, Chang RJ, (1999) .Generation of volatile ammonia from urea fungicidal to *Phellinus noxius* in infested wood in soil under controlled conditions. *plant pathology* .48:337-344.

Charest MH, Beauchamp CJ, Antoun H, (2005). Effects of the humic substances of deinking paper sludge on the antagonism between two compost bacteria and *Pythium ultimum*. *FEMS microbiology ecology.* 52: 219-227.

Chávez-Díaz IF, Angoa-Pérez V, López-Díaz S, Velázquez-del Valle MG, Hernández-Lauzardo AN, (2014). Antagonistic bacteria with potential for biocontrol on *Rhizopus stolonifer* obtained from blackberry fruits. *Fruits.*69:41-46

Choudhary DK, Johri BN, (2009). Interactions of *Bacillus* sp. and plants-With special reference to induced systemic resistance (ISR). *Microbiology Research.* 164: 493-513.

Cimmyt Maize Program, (2004). Maize diseases: a guide for field identification. 4th ed. Mexico (DF): CIMMYT

Combès A, Ndoye I, Bance C, Bruzard J, Djedjat C, Dupont J, Nay B, Prado S, (2012) .Chemical communication between the endophytic fungus *Paraconiothyrium variabile* and the phytopathogen *Fusarium oxysporum*. *PLoS One* . 7:1-11.

Corbaz R, (1990). Principes de phytopathologie et de lutte contre les maladies des plantes. PPUR presses polytechniques.

Das MP, Vennila Devi P, Yasmine Y, (2015) A study on antagonistic potential of bacteria against phytopathogenic fungi. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research* .34: 191-193.

Dedi JKÉ, Diomande BY, (2017). Caractérisation de la mycoflore de grains de maïs (*Zea mays*) destinés à la préparation d'aliments composés pour la volaille. *International Journal of Biological and Chemical Sciences.* 11: 2594-2603

DeEll JR, Murr DP, Wiley L, Porteous MD, (2003). 1-Methylcyclopropene (1-Mcp) Increases Co₂ Injury In Apples. *Acta Horticulturae.600: 277–280.*

Deleu M, Paquot M, Nylander T, (2005). Fengycin interaction with lipidmonolayers at the air-aqueous interface-implications for the effect of fengycinon biological membranes. *Journal of Colloid Interface Science. 283:358–365.*

Di Fracesco A, Roberti R, Martini C, Baraldi E, Mari M, (2015).Activities of *Aureobasidium pullulans* cell filtrates against *Monilinia laxa* of peaches . *Microbiological Research .181:61-67*

Egamberdiva D, Kucharova Z, (2009). selection for root colonising bacteria stimulating wheat growth in saline soils . *Biology and fertility of soils.45:563-57*

Elad Y, Stewart A, (2004) . MICROBIAL CONTROL OF BOTRYTIS SPP: Biology, Pathology and Control. Kluwer Academic Publishers .Printed in the Netherlands . 223–241

El Khoury A, Rizk T, Lteif R, Azouri H, Delia ML, Lebrihi A, (2006) Occurrence of ochratoxin A-and aflatoxin B₁-producing fungi in lebanese grapes and ochratoxin A content in musts and finished wines during 2004. *Journal of agricultural and food chemistry.54:8977-8982*

El mougy NS, (2009). Effect of some essential oils for limiting early blight (*Alternaria Solani*) Development in Potato field. *Journal Of Plant Protection Research .49:58-62*

Emmert EAB, Handelsman J, (1999). Biocontrol of plant disease: a (Gram-) positive perspective. *FEMS Microbiol Letters. 171: 1-9.*

Errakhi R, (2008). Contribution d'actinomycètes (Actinobactéries) à la lutte biologique contre *Sclerotium rolfsii* et rôle de l'acide oxalique dans l'induction des mécanismes de défense. Thèse de Doctorat. Université Cadi Ayyad. Marrakech Maroc.

Fan H, Ru J, Zhang Y, Wang Qi, Yan Li, (2017) .Fengycin produced by *Bacillus subtilis* 9407 plays a major role in the biocontrol of apple ring rot disease. *Microbiological Research .199: 89–97*

Fergus GP, (1977). Extracellular Enzyme Synthesis in the Genus *Bacillus* *Bacteriological Reviews.41:711- 753*

Fiddaman PJ, Rossall S, (1993). The production of antifungal volatiles by *Bacillus subtilis*. *Journal of Applied Bacteriology*. **74**:119-126

Galli, V, Romboli Y, Barbato D, Mari E, Venturi M, Guerrini S, Granchi L, (2021). Indigenous *Aureobasidium pullulans* Strains as Biocontrol Agents of *Botrytis cinerea* on Grape Berries. *Sustainability*.**13**: 1-11

Ghazy N, El-Nahrawy S. (2021). Siderophore production by *Bacillus subtilis* MF497446 and *Pseudomonas koreensis* MG209738 and their efficacy in controlling *Cephalosporium maydis* in maize plant. *Archives of microbiology*. **203**: 1195-1209.

Grzegorzczak M, Żarowska B, Restuccia C, Cirvilleri G, (2017). Postharvest biocontrol ability of killer yeasts against *Monilinia fructigena* and *Monilinia fructicola* on stone fruit. *Food Microbiol*. **61**: 93-101.

Haidar R, Fermaud M, Calvo-Garrido C, Roudet J, Deschamps A, (2016). Modes of action for biological control of *Botrytis cinerea* by antagonistic bacteria. *Phytopathol Mediterr*. **55**:13–34

Han JH, Shim H, Shin JH, Kim KS, (2015). Antagonistic activities of *Bacillus* spp. strains isolated from tidal flat sediment towards anthracnose pathogens *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides* in South Korea. *The plant pathology journal*.**31**:165-175.

Hallenbeck WH, Cunningham-Burns KM, (2012). *Pesticides and human health* . Springer Science & Business Media.

Hotterbeekx A, Kumar-Singh S, Goossens H, MalhotraKumar S, (2017). *In vivo* and *in vitro* interactions between *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus* spp. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. **7**: 106.

Huang CJ, Tsay JF, Chang SY, Yang HP, Wu WS, Chen CY, (2012). Dimethyldisulfide is an induced systemic resistance elicitor produced by *Bacillus cereus* C1L. *Pest Management Science*. **68**: 1306–1310.

Jha Y, (2019). Higher induction of defense enzymes and cell wall reinforcement in maize by root associated bacteria for better protection against *Aspergillus niger*. *Journal of Plant Protection Research*. **59**:341-349

Joseph B, Patra RR, Lawrence R,(2007). Characterization of plant growth promoting rhizobacteria associated with chickpea (*Cicer arietinum* L.). *International Journal of Plant Production*. 1: 141-152.

Jousset A, Lara E, Wall LG, Valverde C, (2006). Secondary metabolites help biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* CHA0 to escape protozoan grazing. *Applied and Environmental Microbiology*.72:7083-7090.

Kachhap S, Chaudhary ANITA, Singh SD, (2015). Response of plant growth promoting rhizobacteria (pgpr) in relation to elevated temperature conditions in groundnut (*Arachis hypogaea* L.). *The Ecoscan*, 9(3and4). 771-778.

Khan N, Bano A, Ali S, Babar M., (2020). Crosstalk amongst phytohormones from planta and PGPR under biotic and abiotic stresses. *Plant Growth Regulation*. 90: 189-203.

Khanh TLV, Le Nguyen T, Le Thi M,Thi MP, Hai TL, (2020) . Selecting *Bacillus* spp. Antagonistof Fungal Phytopathogen *Phytophthora infestans* Causing Tomato Late Blight .*Annual Research & Review in Biology*. 35:32-40

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

Kumar A.J.A.Y, Vandana RS, Singh MONIKA, Pandey KD, (2015). Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR). A promising approach for disease management. *Microbes and environmental management*. Studium Press, New Delhi, 195-209.

Lefort F, (2010). Lutte biologique et lutte microbiologique : des concepts anciens pour des méthodes de lutte modernes. Haute Ecole de Paysage d'ingénierie et d'architecture. Genève

Lima MAS, Oliveira MDCFD, Pimenta AT, Uchôa PK, (2019). *Aspergillus niger*: a hundred years of contribution to the natural products chemistry. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. 30. 2029-2059

Lodewyckx C, Vangronsveld J, Porteous F, Moore ER, Taghavi S, Mezgeay M, Derelie DV, (2002).Endophytic Bacteria at Their Application .Critical Reviews in Plant Sciences.21:583-606.

Loper JE, Scroth MN, (1986). Influence of Bacterial Sources on Indole-3-Acetic Acid on Root Elongation of Sugarbeet. Phytopathology.76:386-389.

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

Lugtenberg B et Kamilova F. (2009). Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria Annu. Rev. Microbiol.63, 541-556.

López-González RC, Juárez-Campusano YS, Rodríguez-Chávez JL, Delgado-Lamas G, Medrano SMA, Martínez-Peniche RÁ, Pacheco-Aguilar JR, (2021). Antagonistic activity of bacteria isolated from apple in different fruit development stages against blue mold caused by *Penicillium expansum*. The plant pathology journal. 37:24

Lugtenberg B, Kamilova F, (2009) . Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria. Annual Review of Microbiology. 63:541-556.

Madbouly AK, Elyousr KAA, Ismail IM, (2020). Biocontrol of *Monilinia fructigena*, causal agent of brown rot of apple fruit, by using endophytic yeasts. Biological Control. 144:104-239.

Manhas RK, Kaur T, (2016). Biocontrol potential of *Streptomyces hydrogenans* strain DH16 toward *Alternaria brassicicola* to control damping off and black leaf spot of *Raphanus sativus*. Frontiers in plant science.7:1869.

Martínez-Absalón S, Rojas-Solís D, Hernández-León R, Prieto-Barajas C, Orozco-Mosqueda MDC, Peña-Cabriales JJ, Santoyo G, (2014). Potential use and mode of action of the new strain *Bacillus thuringiensis* UM96 for the biological control of the grey mould phytopathogen *Botrytis cinerea*. Biocontrol Science and Technology.24:1349-1362.

Ministère de l'Agriculture et de l'Alimentation, (2012). Méthodes physiques. <https://agriculture.gouv.fr/methodes-physiques>, (consulté le 03/09/2021.)

Mueller MG, Schmit JP, (2007).Fungal biodiversity :What do we know? What can we predict? .Biodivers Conserv. 16:1_5

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

Niranjan R, Shetty HS, Reddy MS, (2005). Plant Growth-Promoting Rhizobacteria:Potential Green Alternative For Plant Productivity.Springer,Dordrecht,the Netherlands .In book:PGPR:Biocontrol and Biofertilization 197-216

Nunes CA, (2012). Biological control of postharvest diseases of fruit . Eur. J. Plant Pathol.133: 181–196.

Omar I, O'neill TM, Rossall S, (2006). Biological control of Fusarium crown and root rot of tomato with antagonistic bacteria and integrated control when combined with the fungicide carbendazim. Plant pathology.55: 92-99.

Owolade E, Akinjide TO, Afolabi AR, (2005). Effects of drying of different varieties of maize. Journal of Food Technology. 11: 159-182

Pal KK, McSpadden Gardener B, (2006). Biological Control of Plant Pathogens. *The Plant Health Instructor* .1-25

Park HW, Kim HH, Youn SH, Shin TS, Bilgrami AL, Cho MR, Shin CS, (2012). Biological control potentials of insect-parasitic nematode *Rhabditis blumi* (Nematoda: Rhabditida) for major cruciferous vegetable insect pests. Applied entomology and zoology.47: 389-397.

Paulitz TC, Bélanger RR, (2001). Biological Control in greenhouse systems. Annual review of phytopathology. 39: 103-133.

Raaijmakers JM, Leeman M, Van Oorschot MMP, van der Sluis I, Schippers B,

Bakker PAHM, (1995). Dose-response relationships in biological control of *Fusarium* wilt of radish by *Pseudomonas* spp. Phytopathology.85:1075-1081

Rai A, (2017). Effet du stress salin sur les bactéries du sol: rôle d'extraits dérivés de *Enteromorpha intestinalis*, *Ulva lactuca* et *Opuntia ficus-indica* sur la relation bactérie-plante sous stress salin (Doctoral dissertation, Université Ferhat Abbas Sétif).

- Ramette A, Frapolli M, Défago G, Moëgne-Loccoz Y, (2003).** Phylogeny of HCN Synthase-Encoding hcnBC Genes in Biocontrol Fluorescent Pseudomonads and Its Relationship with Host Plant Species and HCN Synthesis Ability. 16:525-535.
- RAP, Réseau d'avertissements phytosanitaires (2014).** Bulletin d'information No 33–Grandes cultures –19 septembre 2014
- Reetha S, Selvakumar G, Bhuvaneswari G, Thamizhiniya, P, Ravimycin T, (2014).** Screening of cellulase and pectinase by using *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis*. International Letters of Natural Sciences. 8
- Renuka N, Guldhe A, Prasanna R, Singh P, Bux F, (2018).** Microalgae as multi-functional options in modern agriculture: current trends, prospects and challenges . Biotechnology advances. 36: 1255-1273.
- Rhouma A, Triki MA, (2008).** First report of *Pseudocercospora cladosporioides*, the causal agent of *Cercospora* leaf spot of olive trees, in Tunisia. *Phytopathologia mediterranea*. 47: 262-265.
- Rijavec T, Lapanje A, (2016).** Hydrogen cyanide in the rhizosphere: not suppressing plant pathogens, but rather regulating availability of phosphate. *Front Microbiol* .7,1785.
- Rojas-Solís D, Zetter-Salmón E, Contreras-Pérez M, Rocha-Granados MDC, Macías-Rodríguez L, Santoyo, G, (2018).** *Pseudomonas stutzeri* E25 and *Stenotrophomonas maltophilia* CR71 endophytes produce antifungal volatile organic compounds and exhibit additive plant growth-promoting effects. *Biocatal. Agric. Biotechnol*. 13: 46–52.
- Ryu CM, Farag MA, Hu CH, Reddy MS, Wei HX, Paré PW, Kloepper JW, (2003).** Bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 100: 4927-4932.
- Sagahón IP, Anducho-Reyes MA, Silva-Rojas HV, Arana-Cuenca A, Alejandro Tellez Jurado A, Cárdenas-Álvarez IO et Mercado-Flores Y, (2011).** Isolation of Bacteria with Antifungal Activity against the Phytopathogenic Fungi *Stenocarpella maydis* and *Stenocarpella macrospora*. *International Journal of Molecular Sciences*. 12:5522-5537.

Salzer P, Boller T, (2000). Elicitor-induced reactions in mycorrhizae and their suppression. In: Podila GK, Douds DD, eds. Current advances in mycorrhizae research. Minnesota, USA: The American Phytopathological Society. 1–10

Schwarz W, (2001). The cellulosome and cellulose degradation by anaerobic bacteria. Applied microbiology and biotechnology.56: 634-649.

Setua GC, Samaddar KR, (1980). Evaluation of Role of Volatile Ammonia in Fungistasis of Soils. Journal of Phytopathology. 98: 310–319.

Sharma RR, Singh D, Singh R, (2009). Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables by microbial antagonists. Biol. Control. 50: 205-221

Singh A, Mehta S, Singh HB, Nautiyal CS, (2003). Biocontrol of collar rot disease of betelvine (Piper betle L.) caused by Sclerotium rolfsii by using rhizosphere-competent Pseudomonas fluorescens NBRI-N6 and P. fluorescens NBRI-N. Current microbiology.47: 0153-01

Singh M, Singh D, Gupta A, Pandey KD, Singh PK, Kumar A, (2019). Plant growth promoting rhizobacteria: application in biofertilizers and biocontrol of phytopathogens. In PGPR amelioration in sustainable agriculture .Woodhead Publishing . 41-66.

Smith SE, Read DJ, (2008). Mycorrhizal Symbiosis. 3rd Edition. Academic Press, London

Somda I, Sanou J, Sanon P, (2008). Seedborne infection of Farmer-saved maize seeds by pathogenic fungi and their transmission to seedlings. Plant Pathol J. 7:98–103.

Swain SS, Paidesetty SK, Padhy RN, (2017). Antibacterial, antifungal and antimycobacterial compounds from cyanobacteria. Biomedicine & Pharmacotherapy.90:760-776.

Tabli N, Rai A, Bensidhoum L, Palmieri G, Gogliettino M, Cocca E, Nabti E, (2018). Plant growth promoting and inductible antifungal activities of irrigation well water bacteria Biological Control .11:78-86.

Tontou R, Giovanardi D, Ferrari M, Stefani E, (2016). Isolation of bacterial endophytes from Actinidia chinensis and preliminary studies on their possible use as antagonists against Pseudomonas syringae pv. actinidiae. Journal of Berry Research. 6: 395-406.

- Tucson AZ, (2011)** .Garden insects; Natural pest control with beneficial nematodes .
- Van Lenteren JC, (2012)**. The state of commercial augmentative biological control: plenty of natural enemies, but a frustrating lack of uptake. *BioControl*. 57: 1-20.
- Vega K , Kalkum M, (2012)** . Chitin, Chitinase Responses, and Invasive Fungal Infections. *International Journal of Microbiology*.2012:1–10
- Velusamy P, Kim KY, (2011)**. Chitinolytic activity of *Enterobacter* sp. KB3 antagonistic to *Rhizoctonia solani* and its role in the degradation of living fungal hyphae. *Int Res J Microbiol*. 2: 206-214.
- Wani PA, MS Khan A. Zaidi, (2007)**.Synergistic effects of the inoculation with nitrogen-fixing and phosphate-solubilizing rhizobacteria on the performance of field-grown chickpea. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*. 170: 283-287
- Weeden CR, Shelton AM, Hoffman MP, (2007)**. Biological Control: A Guide to Natural Enemies in North America, [En ligne]. <http://www.nysaes.cornell.edu/ent/biocontrol/info/needstatus.html>
- Weller DM, (2007)**. Pseudomonas biocontrol agents of soil borne pathogens: Looking back over 30 years. *Phytopathol*. 97: 250–256
- Whipps J. M. (1987)**. Effect of media on growth and interactions between a range of soil-borne glasshouse pathogens and antagonistic fungi. *New Phytologist*, 107(1), 127-142.
- Widén B, Cronberg N, Widén M, (1994)**. Genotypic diversity, molecular markers and spatial distribution of genets in clonal plants, a literature survey. *Folia Geobotanica*. 29: 245-263.

Liste des annexes

Annexe I : (PBS) Tampon phosphate salin

Compositions	Quantité en (g/l)
NaCl	8
KCl	0,2
KH ₂ PO ₄	0,24
N _a HPO ₄	1,44
pH	7.0 ± 0,2

Annexe II: Les milieu de cultures en (g/l)**❖ Gélose de dénombrement (PCA)**

Compositions	Quantité
Tryptone	5
Glucose	1
Extrait de levure	2,5
Agar	12
pH	7.0 ± 0,2

❖ Le milieu Potato Dextrose Agar (PDA)

Compositions	Quantité
Pomme de terre	200
Glucose	20
Agar	15
pH	5,4± 0,2

❖ Bouillon nutritif (BN)

Compositions	Quantité
Peptone	10
Extrait de levure	5
Chlorure de sodium	5
pH	7 ,2± 0,2

❖ Gélose nutritive (GN)

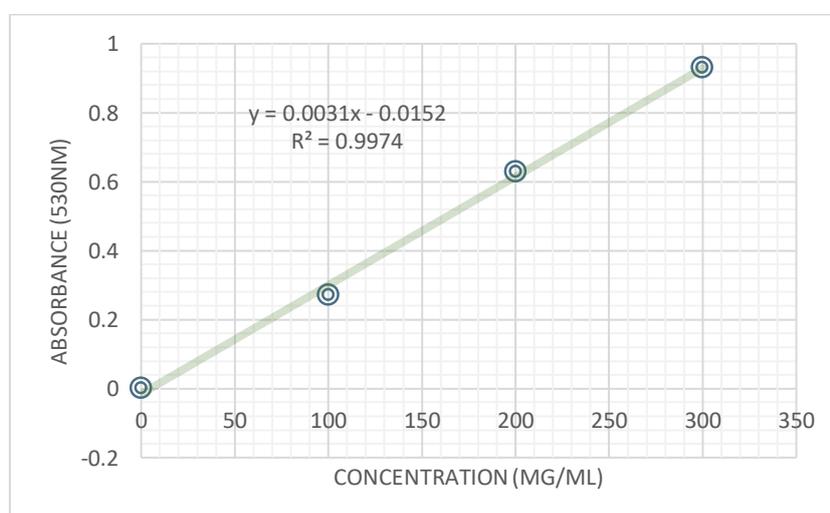
Compositions	Quantité
Peptone	5
Extrait de viande	1
Extrait de levure	2
NaCl	5
Agar	7,5
pH	7,2± 0,2

❖ Luria bertani(LB)

Compositions	Quantité
NaCl	4
Tryptone	10
Extrait de levure	5
Agar	8
pH	7,3± 0,2

❖ Eau peptonée (EP)

Compositions	Quantité \ml
Peptone de caséine	1
Extrait de levure	5
NaCl	5
Tween	1

Annexe III: Courbe d'étalonnage de l'AIA

Résumé :

Les bactéries de la rhizosphère jouent un rôle important dans la lutte contre les champignons phytopathogènes. Notre étude a porté sur la recherche et la sélection de bactéries rhizosphériques à pouvoir antifongique. onze isolats (E1/E2/E4/E5/E6/E7.2/F3.1 /F3.2 / K3/ K7/H2) ont été isolés à partir de la rhizosphère de la tomate prélevés dans la wilaya de Béjaia (Seddouk ouadda). Les isolats sont testé pour leur pouvoir antagoniste à l'égard de quatre champignons phytopathogène (*Aspergillus niger*, *Aspergillus flavipes*, *Fusarium* sp. et *penicillium* sp.). Ils sont également testés pour leur capacité à produire des substances antifongiques (HCN, NH₃), enzymes hydrolytiques (chitinase ; cellulase et protéase) et l'AIA. Le meilleur isolat (F_{3.1}) est sélectionné pour les test *in vivo*. Les résultats des tests *in vitro* ont montré que 81% des isolats présentent une activité antagoniste à l'égard d'au moins un des champignons testés. Les résultats de la production de métabolites à activité antifongiques a montré que la majorité des isolats produisent le NH₃, la protéase et la cellulase, ainsi que l'AIA. La chitinase est produite seulement par l'isolat K3. Le cyanure d'hydrogène, aucun des isolats ne le produit. Concernant le biocôntrole de développement de l'*Aspergillus niger* sur les pommes, l'isolat F_{3.1} *in vivo* présente un effet antagoniste très intéressant, en contrôlant la croissance de presque la totalité de l'agent phytopathogène.

Mots clés : Agents de biocontrol ; Champignons phytopathogènes ; Métabolites antifongiques ; rhizobactéries ; pommes

Abstract:

Rhizobacteria play an important role in biocontrol of phytopathogenic fungi. This present work was focused on the research and the selection of rhizospheric bacteria with antifungal power. Eleven isolates (E1/E2/E4/E5/E6/E7.2/F3.1 /F3.2 / K3/ K7/H2) were isolated from the rhizosphere of tomatoes collected from Bejaia (Seddouk ouadda). The isolates were tested for their antagonistic power against four phytopathogenic fungi (*Aspergillus niger*, *Aspergillus flavipes*, *Fusarium* sp. and *penicillium* sp.). They are also tested for their ability to produce antifungal substances (HCN, NH₃), hydrolytic enzymes (chitinase; cellulase and protease) and IAA. The isolate F_{3.1} was selected for *in vivo* experiments. The results of *in vitro* tests showed that 81% of the isolates showed antagonistic activity against at least one of the tested fungi. The results of the production of metabolites with antifungal activity showed that the majority of the isolates produced NH₃, protease and cellulase, as well as IAA. Chitinase is produced only by the isolate K3. Hydrogen cyanide, it isn't produced by any isolats. Concerning the biocontrol of the growth of *Aspergillus niger* on apples, the isolate F_{3.1} exhibits a very interesting antagonist effect *in vivo*, by controlling the growth of almost all of the phytopathogenic agent.

Key words: *Biocontrol agents, phytopathogenic fungi, Antifungal metabolites, Rhizobacteria ; apples.*