

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université A.MIRA-BEJAIA



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Biotechnologie

Réf :.....

Mémoire
Présenté par

BOUSSALAH Feriel et ABID Nabil

Pour l'obtention du diplôme de
Master Académique/Professionnel

Filière : Biologie
Spécialité : Biotechnologie microbienne

Thème

Isolement et screening de bactéries d'origine aquatique
productrices de molécules antifongiques.

Soutenu le : 07/07/2025

Devant le Jury composé de :

Nom et Prénom	Grade	Qualité
Mme TABTI. D	MCB	Présidente
Mme TABLI. N	MCB	Encadrante
Mme BENSIDHOUM. L	MCA	Co-encadrante
Mme TOUATI. Z	MCB	Examinatrice

Année Universitaire : 2024/2025



Remerciements

Nous tenons à remercier en premier lieu le bon Dieu de nous avoir donnés la santé, la volonté, la foi et le courage pour réaliser ce travail.

*Nous tenons à remercier très profondément **Madame TABLI. N**, de nous avoir encadrés, conseillés et encouragés et permis de travailler dans un cadre très agréable.*

*On tient à exprimer nos profondes reconnaissances à **Madame BENSIDHOUM. L**, notre Co-encadrante pour son encadrement et suivi attentif, son soutien, son enthousiasme et ses conseils avisés tout au long de ce travail.*

*Nous remercions **Mme MOKRANE. F**, la doctorante de laboratoire, pour sa gentillesse, sa serviabilité, sa disponibilité et l'intérêt qu'elle a apporté à notre travail.*

*Nous adressons notre reconnaissance à **Madame TABTI. D**, d'avoir accepter de présider le jury de ce mémoire*

*Nous remercions également **Madame NAIT CHABANE. Z**, qui nous a fait l'honneur d'être l'examinatrice de ce mémoire et pour sa disponibilité et son aide les plus précieux.*

Enfin toute notre sympathie et nos remerciements vont également à tous ceux et celles, qui de près ou de loin, ont contribué à la réalisation de ce mémoire.

Feriel et Nabil.

Dédicaces



Je dédie ce modeste travail à:

Mes chers parents

Mon fils Rayan

Mes filles : Aya, Rym et Lyna

Mon frère Mounir

Mes sœurs

Toute ma famille

Mes amis.

Feriel



Dédicaces



Je dédie ce mémoire :

À mes chers parents, pour leur amour, leurs sacrifices et leur soutien indéfectible

À mes deux sœurs, pour leur présence et leurs encouragements

À ma fiancée, pour sa patience, sa compréhension et son soutien au quotidien

À mes amis, pour leurs mots réconfortants et leur amitié précieuse

Et À mon frère Fateh, que Dieu l'accueille dans Son vaste paradis Inchallah.

Nabil



Tableau N° 01 : Résultats des différents tests d'activités enzymatiques réalisés pour les 29 isolats bactériens.....	37
Tableau N° 02 : Résultats des tests de production d'HCN et NH ₃	42

Figure N°01: Moisissure noire due à <i>Aspergillus niger</i> sur bulbe d'oignon.....	6
Figure N° 02 : Les symptômes de la fusariose chez le blé	7
FigureN°03 : Symptômes de la pourriture bleue causée par <i>penicillium expansum</i> sur pomme.....	8
Figure N°04 : Site de prélèvement des échantillons d'eau de puits.....	17
FigureN°05 : Les dilutions décimales préparées.....	18
Figure N°06: Etapes suivies lors de la sélection des isolats bactériens.....	18
Figure N°07: Aspect des espèces fongiques sur milieu PDA.....	19
FigureN°08: Test d'antagonisme des isolats bactériens à l'égard des champignons phytopathogènes.....	20
Figure N° 09: Recherche de la production de protéase.....	21
Figure N°10: Recherche de l'activité uréasique.....	22
Figure N° 11: Recherche des deux activités estérasique et lipasique.....	23
Figure N°12: Recherche de l'activité amylasique.....	24
Figure N° 13: Recherche de l'activité cellulasique.....	24
Figure N° 14: Production de cyanure d'hydrogène (HCN).....	25
Figure N° 15: Production d'ammoniac (NH ₃).....	26
Figure N° 16: Production de molécules antifongiques volatiles.....	27
Figure N° 17: Inhibition de la pourriture noire d' <i>Aspergillus niger</i> sur fruits de tomate.....	29
Figure N°18: Pourcentage d'inhibition de la croissance des trois champignons phytopathogènes par les 29 isolats bactériens testés.....	31
Figure N° 19: Effet antagoniste de quelques isolats sur les champignons phytopathogènes testés.....	32
Figure N° 20: Aspect de quelques résultats d'activités enzymatiques testées sur boîtes.....	36
Figure N° 21: Résultats du test de production d'Acide cyanhydrique(HCN) comparés au témoin négatif.....	43
Figure N° 22 : Résultats du test de production d'ammoniac (NH ₃) comparés au témoin négatif.....	44

Figure N° 23: PGI% d' <i>Aspergillus niger</i> obtenu suite la production des substances volatiles par les isolats.....	45
Figure N°24 : Effet des substances volatiles sur la croissance et l'aspect mycéliend' <i>Aspergillus niger</i> . 1 : témoin ; 2 : isolat F4.....	45
Figure N°25: Résultats de surface de lyse sur fruits de tomate obtenus avec les isolats A1 et A2 avec (**P<0.005).....	48
Figure N°26: Inhibition de la pourriture d' <i>Aspergillus niger</i> par l'isolat A1 sur fruits de tomate. C: contrôle négatif.....	48

FAO	Food and Agruculture Organizaion
GN	Gélose Nutritive
HCN	Cyanure d'Hydrogène
NH₃	Ammoniac
PCA	Plate Count Agar
PDA	Pommede terre Dextrose Agar « Potato Dextrose Agar »
PGI	Pourcentage d'inhibition de la croissance « Percentage GrowthInhibition »
PGPR	Plant Growth Promoting Rhizobacteria
pH	Potentiel d'hydrogène
TSA	Trypticase Soja Agar

Sommaire

Liste des tableaux
Listes des figures
Liste des abréviations

Introduction	1
--------------------	---

Partie bibliographique

Chapitre I : La phytopathologie

1. Définition de la phytopathologie	3
2. Agents phytopathogènes.....	3
3. Champignons phytopathogènes.....	4
4. Exemples de champignons phytopathogènes.....	5
4.1. <i>Aspergillus niger</i>	5
4.2. <i>Fusarium</i> sp.....	6
4.3. <i>Penicillium</i> sp.....	7

Chapitre II: Le biocontrôle

1. Définition	9
2. Agents debiocontrôle.....	9
2.1. Bactéries	9
2.2. Champignons.....	10
2.3. Virus.....	10
2.4. Nématodes	10
2.5. Protozoaires.....	11
3. Mécanismes de biocontrôle	11
3.1. Compétition.....	11
3.2. Antibiose	12
3.3. Production d'enzymes hydrolytiques.....	12
4. Avantages et inconvénients de biocontrôle	12
4.1. Avantages du biocontrôle	12

4.1.1. Préservation de la biodiversité.....	12
4.1.2. Respect de l'environnement.....	13
4.1.3. Compatibilité avec les stratégies de gestion intégrée.....	13
4.1.4. Réduction du risque de résistance.....	13
4.1.5. Sécurité accrue pour la santé humaine.....	13
4.2. Inconvénients du biocontrôle.....	13
4.2.1. Efficacité variable selon les conditions environnementales.....	13
4.2.2. Temps d'action plus lent.....	13
4.2.3. Problèmes de formulation, stockage et application.....	13
4.2.4. Coûts de développement élevés et accès réglementaire difficile.....	13
4.2.5. Spectre d'action parfois trop restreint.....	14
5. Autres moyens de lutte.....	14
5.1. Lutte chimique.....	14
5.2. Lutte mécanique.....	14
5.3. Lutte physique.....	15
5.4. Lutte intégrée.....	15

Partie expérimentale

Matériel et Méthodes

1. Matériel.....	16
1.1 Matériel biologique.....	16
1.2. Matériel non biologique	16
2. Méthodes.....	16
2.1. Prélèvement des échantillons d'eau de puits	16
2.2. Isolement et purification des bactéries.....	17
2.3. Mise en évidence de l'activité antifongique.....	19
2.3.1. Repiquage des souches fongiques.....	19
2.3.2. Repiquage des isolats bactériens.....	19
2.3.3. Effet antagoniste des isolats bactériens à l'égard des trois champignons par confrontation directe sur boîte.....	19
2.4. Caractérisation métabolique et fonctionnelle.....	21
2.4.1. Activités enzymatiques.....	21
2.4.1.1. Activité protéasique.....	21
2.4.1.2. Activité uréasique.....	22

2.4.1.3. Activité estérasique et lipasique.....	22
2.4.1.4. Activité amylasique.....	23
2.4.1.5. Activité cellulasique.....	24
2.4.2. Recherche de métabolites bioactifs antifongiques.....	25
2.4.2.1 Production de cyanure d'hydrogène (HCN).....	25
2.4.2.2 Production d'ammoniac (NH ₃).....	25
3. D'autres molécules antifongiques volatiles.....	26
4. Inhibition de la pourriture noire d' <i>Aspergillus niger</i> sur fruits de tomate par les isolats bactériens.....	28
5. Analyse statistique.....	29

Résultats et discussion

1. Prélèvement d'échantillons d'eau et isolement de bactéries.....	30
2. Mise en évidence de l'activité antifongique.....	30
3. Caractérisation métabolique et fonctionnelle.....	35
3.1. Activités enzymatiques.....	35
3.1.1. Activité protéasique.....	38
3.1.2. Activité uréasique.....	39
3.1.3. Activité lipasique et estérasique.....	39
3.1.4. Activité amylasique.....	40
3.1.5. Activité cellulasique.....	41
3.2. Recherche de métabolites bioactifs à activité antifongique.....	41
3.2.1. Production de cyanure d'hydrogène (HCN).....	42
3.2.2. Production d'ammoniac (NH ₃).....	43
4. D'autres molécules volatiles.....	44
5. Inhibition de la pourriture noire d' <i>Aspergillus niger</i> sur fruits tomate par les isolats bactériens.....	47
Conclusion.....	51
Références bibliographiques.....	52
Annexes	
Résumé	

Les produits alimentaires d'origine végétale constituent l'une des principales sources pour la nutrition humaine. Vu la demande croissante de la population mondiale et afin de satisfaire les besoins alimentaires, la production végétale devrait augmenter de 60% d'ici 2050 (Booth et al., 2022).

Les maladies causées par les agents phytopathogènes ont un impact négatif sur la croissance et le développement des végétaux en diminuant ainsi la productivité de nombreuses cultures dans le monde (Ahmed et al., 2021). Ces maladies sont probablement les plus grands obstacles pour la production et pour le rendement global des récoltes, aussi des principaux facteurs limitant et altérant leur qualité (Morcia et al., 2015). Pour cela, les agriculteurs doivent faire face aux différents problèmes auxquels ils sont confrontés chaque année pour avoir une meilleure production annuelle (Booth et al., 2022), et ce résultat n'est atteint que par l'utilisation de pesticides chimiques. Ces derniers sont largement utilisés pour lutter contre les agents phytopathogènes nuisibles grâce à leur efficacité et leur application facile et pratique (Magan et Olsen, 2004).

Malgré l'efficacité indiscutable des pesticides chimiques, leur utilisation accrue et parfois irrationnelle est souvent accompagnée de plusieurs problèmes sanitaires et environnementaux (Walia et al., 2021), car capables de causer un déséquilibre dans l'écosystème naturel en agissant négativement sur la microflore rhizosphérique (Singh et al., 2019). La plupart de ces produits peuvent causer une dégradation de la fertilité des sols et une pollution grave de l'environnement, ce qui a un impact sur la santé humaine (Kumar et al., 2018). Il est bien confirmé que, l'augmentation de l'utilisation de ces intrants chimiques entraîne plusieurs effets négatifs, en raison de trois facteurs : leurs toxicités chimiques sur les organismes non cibles (oiseaux, poissons et voir Homme), l'apparition de résistances qui leur font perdre en efficacité et enfin la contamination de l'environnement par les résidus (Belhadi et al., 2016).

En fait, les spécialistes signalent la situation, et les agriculteurs sont soumis à une forte pression pour réduire ou éliminer l'application des pesticides chimiques (BautistaBanos, 2014), ce qui rend plus crucial de rechercher de nouvelles méthodes de lutte alternatives efficaces, sûres et respectueuses de l'environnement par l'utilisation de certains agents de biocontrôle (Deshwal et al., 2003; Daabé et al., 2017; Ahmed et al., 2021).

Le biocontrôle ou la lutte biologique implique l'utilisation des ennemis naturels pour éliminer complètement ou partiellement les populations de pathogènes nuisibles (Hamlaoui et

Benamer, 2018), cette approche de lutte consiste à appliquer des produits vivants tels que les micro-organismes ou non vivants d'origine naturelle, tels que les huiles essentielles et les extraits de plantes pour lutter contre les maladies des plantes (Nollet, 2015; Elnahal et al., 2022).

Dans ce contexte, le biocontrôle est devenu l'une des solutions attirant l'attention des chercheurs à travers le monde. En effet, le marché mondial des agents de lutte biologique représente aujourd'hui environ 5% à 6% du total des pesticides (Booth et al., 2022).

Dans ce présent travail, vingt-neuf isolats bactériens isolés à partir d'un puits d'irrigation du village Djebira (Wilaya de Béjaia) ont été étudiés ; en premier, pour leur effet antagoniste à l'égard de trois champignons phytopathogènes à savoir, *Aspergillus niger*, *Penicillium* sp et *Fusarium* sp, puis pour leur production de molécules antifongiques et de molécules stimulatrices de la croissance des plantes, enfin un test *in vivo* sur des fruits de tomate est réalisé à l'égard d'*Aspergillus niger*.

Le présent manuscrit est scindé en deux parties :

- Une première partie théorique, il s'agit d'une synthèse bibliographique qui est scindée en deux chapitres :

Le premier est réservé pour la phytopathologie, le deuxième est consacré au biocontrôle et les moyens de lutte directe et indirecte.

- Une deuxième partie pratique, détaillant le matériel et les méthodes utilisés dans cette investigation suivie d'une présentation des résultats obtenus et leur discussion.

Enfin, on termine par une conclusion retraçant l'ensemble des résultats obtenus suivi de quelques perspectives.

Les maladies des plantes sont un véritable problème pour les cultures agricoles, les dommages causés par ces maladies et les ravageurs deviennent de plus en plus pénibles en raison de l'extension des cultures intensives (Morcia et al., 2015). Des pertes considérables (16% de la production annuelle) sont enregistrées chaque année suite aux différents types de maladies (d'origines biotiques ou abiotiques) (Booth et al., 2022).

1. Définition de la phytopathologie

La phytopathologie se définit comme étant l'étude des maladies des plantes au cours de leur croissance, mais aussi les altérations des produits végétaux après leurs récoltes (Corbaz, 1990; Lepoivre, 2003). En plus, cette science se concentre sur les méthodes de prévention et de contrôle des maladies des plantes (Knudsen et Dandurand, 2013). C'est un domaine en plein développement, avec des recherches révélant sans cesse de nouvelles informations (Stewart et Globig, 2011).

Une maladie cryptogamique, aussi appelée maladie fongique est une maladie causée par un champignon, qui est un organisme filamenteux à caractère parasite. La mycologie est l'étude des champignons, et la mycologie végétale est une branche de la phytopathologie (Jean, 2023). Ces maladies se propagent lorsque les spores fongiques sont transportées par le vent, la pluie ou suite à des contacts directs (Orlici et Benkara, 2018). D'après Jean, 2023, environ 90 % des maladies des végétaux sont d'origine fongique.

2. Agents phytopathogènes

D'après les estimations de la production agricole mondiale, 50 % de cultures végétales sont perdues avant ou après récolte suite aux attaques par des agents phytopathogènes (Choudhary et al., 2009). Ces agents sont des micro-organismes ubiquistes qui affectent les plantes, ils sont les plus destructeurs et causent des dégâts considérables aux cultures. Ils sont généralement infectieux car ils envahissent l'hôte et s'y multiplient et ils sont contagieux par leur transmission d'une plante infectée à une plante saine (Benmehidi et Boukaabache, 2018).

Les maladies parasitaires des plantes sont provoquées par plusieurs types d'agents pathogènes, notamment les champignons, les bactéries, les virus, les protozoaires et les phanérogames parasites (Choudhary et al., 2009 ; Bettou et Righi, 2018). Ces agents phytopathogènes sont répartis selon les proportions suivantes : Champignons (47%),

bactéries (10%), virus (7%) et nématodes (2%) (Choudhary et Varma, 2016).

Les bactéries (environ 200 espèces) sont des organismes procaryotes dont le génome est porté par des chromosomes bactériens et des plasmides. Des bactéries phytopathogènes telles qu'*Agrobacterium*, *Pseudomonas* et *Rhizobium* sont publiées dans Hélène, (2010).

Les virus (plus de 500 espèces) sont des parasites intracellulaires stricts. Leur fonctionnement est souvent peu connu, les infections virales provoquent de nombreux types de symptômes (nécrosé, nanisme, chloroses...) qui sont parfois exploités en horticulture pour leur propriétés ornementales. Ces symptômes ne suffisent pas généralement pour identifier l'agent pathogène car ils dépendent du milieu, de la variété de plante, et de la souche virale (Selosse et Gibert, 2011).

3. Champignons phytopathogènes

Les champignons présentent une très grande variété taxonomique du fait de l'organisation complexe de leur appareil végétatif et de leur mode de reproduction (Hélène, 2010). Ils sont réunis au sein du règne des Fungi ou Mycota (Richardson et Warnock, 2012). À ce jour, environ 150 000 espèces de champignons ont été décrites, bien que le nombre total d'espèces existantes soit estimé à environ 2,2 à 3,8 millions. Cela suggère que les champignons sont parmi les espèces de biodiversité les moins exploitées sur notre planète (Webster et Weber, 2007; Hawksworth et Lücking, 2017; Blaaid et Khomich, 2021).

Les champignons constituent le groupe le plus diversifié d'agents phytopathogènes et sont responsables de 70% à 80% des maladies de plantes. Plus de 20 000 espèces de champignons sont de nature parasitaire et peuvent causer des maladies dans les cultures et les plantes (Ray et al., 2017).

Les maladies cryptogamiques sont causées par plusieurs champignons phytopathogènes, les spores de ces champignons se disséminent et se déposent sur les plantes. Là, elles germent et pénètrent dans les tissus, après une période d'incubation, le mycélium fongique se développe et ainsi les premiers symptômes apparaissent : feuilles nécrosées, rameaux tachés, etc... (Agrios, 2005). Leurs effets néfastes sur les plantes se manifestent par une diversité de symptômes qui peuvent affecter tous les organes du végétal (Selosse et Gibert, 2011; Pujari et al., 2015). Certains agents pathogènes fongiques apparaissent sur les

feuilles et les tissus végétaux de la plante, tels que l'oïdium, le mildiou, la pourriture des fruits, les taches, tandis que certaines espèces attaquent les racines, telles que les agents pathogènes de la pourriture des racines *Pythium* et *Botrytis*. D'autres infectent les vaisseaux porteurs tels que les agents pathogènes du flétrissement : comme *Fusarium* et *Verticillium* (Mihoubi, 2021).

Les champignons phytopathogènes affectent de nombreuses cultures vivrières, en particulier les céréales et les légumineuses, les rendant ainsi impropres à la transformation et à la consommation (Dabé et al., 2017). Ces agents phytopathogènes peuvent parfois devenir une menace sérieuse pour la sécurité alimentaire, tel que le cas de la famine Irlandaise causée par le champignon *phytophthora infestans* et la famine du Bengale causée par l'espèce *Helminthosporium oryzae* (Choudhary et Virma, 2016).

4. Exemples de champignons phytopathogènes

Plusieurs genres de champignons telluriques sont capables d'infecter des plantes sauvages ou cultivées et causer des dégâts importants. Il s'agit notamment des genres : *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Alternaria*, *Rhizoctonia*, *verticillium* et *Pythium* (Agrios, 2005). D'après, (Ikhou, 2011), les principaux agents phytopathogènes responsables de la détérioration des fruits commercialisés en Algérie sont des souches appartenant aux genres : *Aspergillus*, *Fusarium* et *Alternaria*. Aouar, (2012) ainsi que Nyongesa et al., (2015) ont signalé que les genres : *Aspergillus* et *Penicillium* sont les plus dominants, ils sont dotés d'un grand pouvoir de dissémination.

4.1. *Aspergillus niger*

Aspergillus niger est un champignon Ascomycète (Perfect et al., 2001), filamenteux ubiquiste qui se développe en aérobiose sur la matière organique (Madian et al., 2020), il est omniprésent dans l'environnement et pouvant se développer sur différents substrats tel que la matière organique décomposée, le sol, le compost et les fruits secs (Morin et al., 1994 ; Aleksic et al., 2017). C'est l'une des espèces du genre *Aspergillus* les plus communes responsables de la pourriture post récolte des fruits frais (Schuster et al., 2002), en raison de sa limite d'activité de l'eau, qui est de 0,88, relativement élevée par rapport aux autres espèces, et sa capacité de pousser dans une large gamme de pH (Madian et al., 2020), en présence des conditions propices à leur développement, notamment au cours du stockage, cette espèce peut devenir un parasite (Houissa, 2020). *Aspergillus niger* est à l'origine de la pourriture des fruits

frais, des céréales, des graines de cacao et de café (Lima et al., 2019), l'oignon est considéré comme le légume le plus sensible et le plus touché par *Aspergillus niger*. (Pal et al., 2014; Lima et al., 2019). (Voir figure N° : 01).



Figure N° 01 : Moisissure noire due à *Aspergillus niger* sur un bulbe d'oignon (Pal et al., 2014).

4.2. *Fusarium*

Les champignons du genre *Fusarium* sont cosmopolites, il y a au moins 70 espèces de *Fusarium* définies et bien décrites (Munkvold, 2017), ils appartiennent à la classe des Deutéromycètes. Certaines espèces connues par leurs formes parfaites ou téléomorphes, appartiennent à la classe des Ascomycètes (Houissa, 2020).

Ce champignon a de très larges spectres d'hôtes, il infecte des plantes herbacées et ligneuses (Miloud, 2018), capable de causer des infections qui sont réunies sous le nom de fusarioses (Heit, 2015), les symptômes les plus distinctifs sont les pousses desséchées, les feuilles et les tiges de couleur blanchie (Frate et Davis, 2007). L'ensemble des symptômes croîtrait, surtout lorsqu'elles sont sensibles ou lorsque les conditions environnementales sont exceptionnellement favorables pour l'agent pathogène (Benabdi, 2017), provoquant une dégradation progressive des cultures végétales (Undersander et Cosgrove, 2011). La fusariose est une maladie fongique nuisible pour une large gamme de céréales. Elle peut être causée par

une vingtaine d'espèces du genre *Fusarium* (Bettou et Righi, 2018). Il est bien établi que cette maladie présente une incidence directe sur les rendements suite à une diminution de la qualité et de nombre de grains par épi accompagnée du risque de présence de mycotoxine dans les grains (Derdj, 2017). (Voir figure N°: 02).

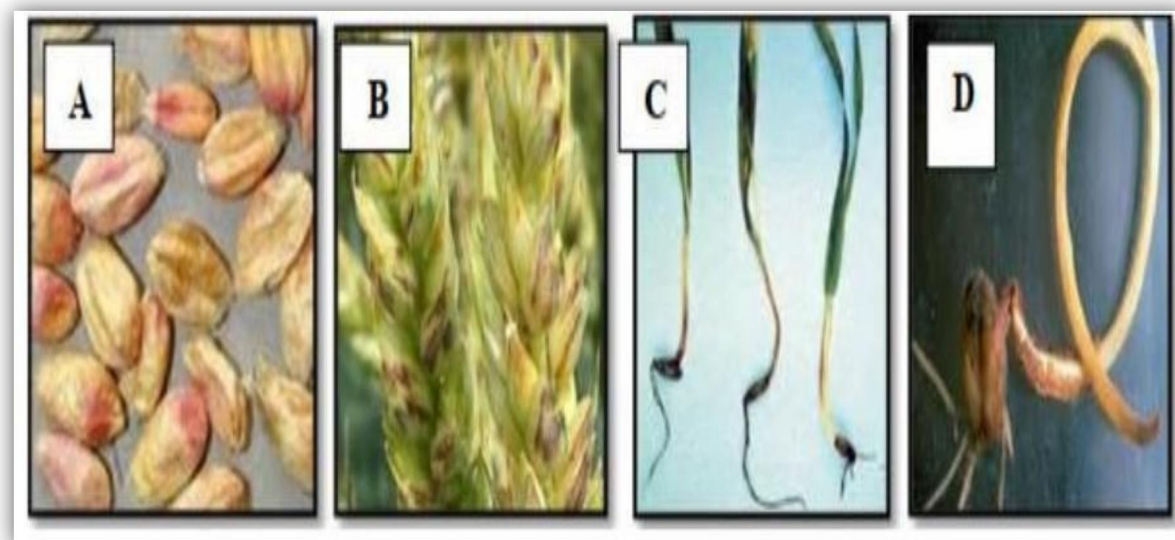


Figure N° 02: Les symptômes de la fusariose chez le blé: A) grains de blé provenant d'épis variablement infectés, B) épis de blé atteints d'une fusariose présentant des symptômes de nécroses, C) pourriture des tiges et des racines au stade plantule, D) grains de blé infectés par *Fusarium* au stade de germination (Orlici et Benkara, 2018).

4.3. *Penicillium*

Penicillium est l'un des champignons les plus courants, ubiquitaire et cosmopolite (Visagie et al., 2014). Il est estimé qu'il regroupe actuellement 483 espèces, un nombre en constante augmentation au fur et à mesure de la révision de sa taxonomie (Houbraken et al., 2020).

Le genre *Penicillium* fait partie des champignons filamenteux appartenant au phylum des Ascomycètes. Ils sont omniprésents, polyphages et saprophytes mais peuvent devenir parasites en présence d'humidité au cours du stockage (Houissa 2020), ils sont fréquemment retrouvés dans les denrées alimentaires comme les céréales, les arachides et les produits laitiers (Storey et al., 2004), les fruits à pépins (pommes, poires, raisins, etc...), (figure N°:3) ainsi que les fruits à noyau (cerises, pêches, prunes, etc...) (Nguyen, 2007), ils sont également

considérés comme des contaminants communs des laboratoires (Houissa, 2020).



Figure N° 03: Symptômes de la pourriture bleue causée par *penicillium expansum* sur pomme (Tannous, 2015).

1. Définition

Le biocontrôle est un concept de protection envers les bioagresseurs des plantes cultivées des zones agricoles, ou de régulation de leurs populations, dans les jardins, les espaces verts, les infrastructures et les forêts. Il concerne aussi la protection des denrées stockées et des semences (Jean-Philippe et al., 2022). De sa part, Piacibello, (2021) confirme que le biocontrôle est très proche de la protection biologique intégrée, qui fait appel à un ensemble de méthodes combinées comprenant la lutte biologique, les mesures prophylactiques, l'emploi de variétés génétiquement résistantes ou tolérantes aux bioagresseurs. l'association végéphyll (anciennement Association Française de Protection des Plantes –AFPP) propose également de rapprocher la définition de «biocontrôle» de celle de « protection biologique » dans son glossaire terminologique (depuis 2011): « Méthode qui consiste à réguler les populations de bioagresseurs par l'utilisation d'agents naturels agissant sur les mécanismes naturels et appartenant soit au règne animal, soit au règne végétal, soit au domaine des microorganismes, soit au domaine des substances minérales, ou qui en dérivent ». Les synonymes indiqués sont « bioprotection » et « lutte biologique » (Jean-Philippe et al., 2022).

2. Agents de biocontrôle

La lutte biologique avec les microorganismes bénéfiques permet d'augmenter le rendement en supprimant directement l'inoculum pathogène et/ou en induisant la résistance des plantes. Plusieurs travaux ont été entrepris pour la sélection des antagonistes aux microorganismes phytopathogènes afin de les utiliser comme agents potentiels de lutte biologique (Si Amar, 2017).

2.1.Bactéries

Certaines bactéries, notamment les genres *Bacillus* et *Pseudomonas*, présentent une activité antifongique significative et sont utilisées comme agents de biocontrôle contre divers champignons phytopathogènes. *Bacillus pumilus*, par exemple, produit des lipopeptides et des enzymes capables de dégrader les parois cellulaires des champignons, contribuant ainsi à la suppression de pathogènes fongiques dans les sols agricoles (Dobrzyński et al., 2023). De même, *Pseudomonas fluorescens* a montré une activité antifongique contre plusieurs pathogènes, dont *Fusarium oxysporum* et *Rhizoctonia solani*, grâce à la production de composés antifongiques spécifiques (Riera et al., 2023). Ces interactions complexes font des

bactéries antifongiques des outils potentiels dans la lutte biologique contre les champignons pathogènes, tout en favorisant la biodiversité des sols.

2.2. Champignons

Les champignons sont capables d'inhiber d'autres champignons phytopathogènes par des mécanismes tels que le mycoparasitisme, la compétition ou la production de composés antifongiques. *Trichoderma harzianum*, par exemple, sécrète des enzymes lytiques comme les chitinases, ainsi que des métabolites secondaires antifongiques qui ciblent directement les parois cellulaires des champignons phytopathogènes, réduisant ainsi leur virulence (Fayaz A et al., 2021). Ce champignon peut également induire des mécanismes de défense systémique chez les plantes, augmentant leur résistance aux maladies (Zin & Badaluddin, 2020). Par ailleurs, certaines espèces de genres *Penicillium* et *Aspergillus* sont également étudiés pour leur potentiel antifongique en raison de leur capacité à produire des stéroïdes et des métabolites bioactifs aux propriétés antifongiques intéressantes (Charmaine et al., 2023; Lei et al., 2025). Ces champignons antifongiques jouent donc un double rôle : limiter la prolifération des agents pathogènes fongiques tout en favorisant la santé des plantes dans les agroécosystèmes.

2.2. Virus

Les *mycovirus* sont des virus qui infectent exclusivement les champignons et suscitent un intérêt croissant pour leur potentiel en tant qu'agents de biocontrôle. Ces virus peuvent réduire la virulence de leurs hôtes fongiques, un phénomène connu sous le nom d'hypovirulence, ce qui permet de limiter la propagation de maladies fongiques chez les plantes (Hough et al., 2023). Transmis principalement par contact hyphal, les *mycovirus* n'affectent ni les plantes ni les animaux, ce qui les rend sûrs pour une utilisation en agriculture durable (Schneider & Ghabrial, 2024).

2.4. Nématodes

Les nématodes antifongiques jouent un rôle essentiel dans la régulation des champignons phytopathogènes, principalement par prédation directe ou via des symbioses bactériennes. Par exemple, des nématodes mycophages du genre *Aphelenchoides* se nourrissent activement des hyphes fongiques, contribuant ainsi à la réduction de leur propagation dans les sols agricoles (Crow et al., 2019). D'autre part, les nématodes entomopathogènes du genre *Steinernema* hébergent des bactéries symbiotiques telles que : *Xenorhabdus* et *Photorhabdus*, qui produisent des métabolites antifongiques, renforçant ainsi leur efficacité dans le contrôle des pathogènes fongiques (González et al., 2021).

2.5. Protozoaires

Les protozoaires libres, jouent un rôle essentiel dans la régulation des populations de champignons pathogènes. C'est le cas des amibes, capables de phagocyter des spores ou des hyphes fongiques, limitant ainsi leur développement dans divers environnements. Par exemple, *Dictyostelium discoideum* a été utilisé comme modèle pour étudier les interactions entre les amibes et les bactéries phytopathogènes, mettant en évidence les mécanismes de défense de l'hôte et la résistance des pathogènes à la phagocytose (Müller et al., 2013). De plus, *Acanthamoeba* spp sécrète diverses enzymes, comme des protéases et des phospholipases, qui participent à la dégradation de microorganismes, incluant certains champignons pathogènes (Siddiqui & Khan, 2012).

3. Mécanismes de biocontrôle

Les agents de biocontrôle agissent principalement par compétition, antibiose et production d'enzymes hydrolytiques. La compétition permet de priver les pathogènes de nutriments ou d'espace vital, tandis que l'antibiose repose sur la sécrétion de molécules antimicrobiennes comme les lipopeptides. Par ailleurs, certaines bactéries et champignons produisent des enzymes comme les chitinases et les glucanases, capables de dégrader les parois des champignons phytopathogènes (Fan et al., 2021 ; Medeiros et al., 2021). Ces mécanismes naturels offrent une solution durable pour protéger les cultures sans nuire à l'environnement.

3.1. Compétition

La compétition spatiale et nutritionnelle est un mécanisme fondamental dans les interactions microbiennes en biocontrôle. Des bactéries bénéfiques, telles que *Pseudomonas fluorescens* et *Bacillus subtilis*, colonisent rapidement la rhizosphère et produisent des métabolites secondaires, comme les sidérophores, qui limitent l'accès des pathogènes au fer, qui est un nutriment essentiel (Haas & Défago, 2005). Par ailleurs, *Bacillus subtilis* forme des biofilms denses sur les racines, créant une barrière physique qui empêche l'implantation des agents pathogènes (Blake et al., 2021). Ces interactions indirectes jouent un rôle crucial dans la prévention des maladies des plantes et sont intégrées dans les stratégies agricoles durables actuelles (Zhang et al., 2023).

3.2. Antibiose

L'antibiose constitue un mécanisme clé dans le biocontrôle microbien, reposant sur la capacité de certains microorganismes à produire des substances antimicrobiennes inhibant la croissance des agents pathogènes. Par exemple, *Bacillus velezensis* est reconnu pour la synthèse de lipopeptides tels que la surfactine, la fengycine et l'iturine, qui perturbent l'intégrité des membranes fongiques (Fan et al., 2017). De son côté, *Pseudomonas fluorescens* produit des composés bioactifs comme la 2,4-diacétylphloroglucinol (DAPG) et des phénazines, dont l'efficacité antifongique contre des pathogènes telluriques tels que *Rhizoctonia solani* a été démontrée (Riera et al., 2023). De plus, les lipopeptides produits par *B. Velezensis*, notamment la fengycine, ont montré une activité antifongique significative contre *Colletotrichum gloeosporioides* et *Colletotrichum Musae*, soulignant leur potentiel en tant qu'agents efficaces de biocontrôle (Jumpathong et al., 2022).

3.3. Production d'enzymes hydrolytiques

De nombreux micro-organismes impliqués dans le biocontrôle exploitent la production d'enzymes hydrolytiques pour affaiblir et dégrader les structures des agents phytopathogènes. *Bacillus amyloliquifaciens*, par exemple, est capable de produire des chitinases et des glucanases, qui ciblent respectivement la chitine et les β -glucanes, composants essentiels de la paroi cellulaire fongique (Chen et al., 2009). De son côté, *Pseudomonas chlororaphis* libère des protéases et des lipases qui déstabilisent les membranes fongiques et inhibent leur croissance (Siddiqui, 2006). Quant aux espèces de *Trichoderma*, elles sont connues pour leur synthèse des cellulases, des β -1,3-glucanases et des chitinases, qui coopèrent pour perforer la paroi fongique et provoquer la lyse cellulaire (Harman et al., 2004). Ces activités enzymatiques coordonnées renforcent considérablement l'efficacité de l'agent de biocontrôle en perturbant directement l'intégrité physique des pathogènes ciblés.

4. Avantages et inconvénients de biocontrôle

4.1. Avantages du biocontrôle

4.1.1. Préservation de la biodiversité

En ciblant spécifiquement certains organismes nuisibles, le biocontrôle préserve les espèces bénéfiques et contribue au maintien de l'équilibre écologique (Glare et al., 2012).

4.1.2. Respect de l'environnement

Le biocontrôle utilise des agents biologiques naturels qui n'engendrent pas de pollution durable des sols, de l'eau ou de l'air, contrairement aux produits chimiques de synthèse (Chandler et al., 2011).

4.1.3. Compatibilité avec les stratégies de gestion intégrée

Le biocontrôle s'inscrit parfaitement dans les programmes de gestion intégrée des ravageurs utilisés en agriculture durable (Stenberg, 2017).

4.1.4. Réduction du risque de résistance

Les agents biologiques exercent souvent une pression de sélection plus faible que les pesticides chimiques, réduisant ainsi le développement de résistances chez les pathogènes (Bardin et al., 2015).

4.1.5. Sécurité accrue pour la santé humaine

Les agents biologiques sont généralement considérés comme moins toxiques pour les humains et les animaux que les pesticides chimiques (FAO, 2021).

4.2. Inconvénients du biocontrôle

4.2.1. Efficacité variable selon les conditions environnementales

Les performances des agents biologiques peuvent être fortement influencées par des facteurs externes comme la température, l'humidité, ou la lumière, rendant parfois leur action moins fiable que celle des pesticides chimiques (Glare et al., 2012).

4.2.2. Temps d'action plus lent

Contrairement aux pesticides chimiques qui peuvent agir rapidement, les agents de biocontrôle nécessitent parfois plusieurs jours pour produire un effet notable sur les populations de pathogènes (Bardin et al., 2015).

4.2.3. Problèmes de formulation, stockage et application

Certains biopesticides ont une durée de conservation limitée, et leur efficacité peut diminuer s'ils ne sont pas stockés dans des conditions optimales (Chandler et al., 2011).

4.2.4. Coûts de développement élevés et accès réglementaire difficile

Le développement, la production et la commercialisation des produits de biocontrôle peuvent être coûteux, en raison notamment des exigences réglementaires strictes, ce qui peut diminuer leur disponibilité sur le marché (Marrone, 2019).

4.2.5. Spectre d'action parfois trop restreint

Beaucoup d'agents de biocontrôle sont très spécifiques à certains organismes cibles, ce qui oblige parfois l'agriculteur à utiliser plusieurs produits pour gérer des complexes divers de pathogènes (Stenberg, 2017).

5. Autres moyens de lutte

Les stratégies de protection des plantes contre les agents phytopathogènes varient en fonction de l'espèce végétale, du type de pathogène, de leur interaction et des conditions environnementales. L'objectif principal de ces méthodes est de lutter contre les maladies, en particulier celles causées par les champignons phytopathogènes, afin d'améliorer à la fois la qualité et le rendement des productions agricoles.

5.1. Lutte chimique

La lutte chimique repose sur l'utilisation de substances chimiques (pesticides, fongicides, herbicides, insecticides) visant à éliminer ou contrôler les organismes nuisibles. Cette méthode, largement utilisée en agriculture intensive, présente l'avantage d'une action rapide et efficace sur une large gamme de pathogènes et de ravageurs (Carvalho, 2017). Toutefois, son usage intensif est associé à des effets négatifs importants, notamment la pollution des sols et des eaux, l'impact sur la biodiversité, ainsi que le développement de résistances chez les organismes ciblés (Pimentel, 2005). De plus, l'exposition prolongée à certains produits chimiques peut avoir des effets délétères sur la santé humaine, entraînant des maladies chroniques (Mostafalou & Abdollahi, 2017). Ces risques environnementaux et sanitaires ont conduit à une réglementation plus stricte de nombreux produits phytosanitaires et à l'émergence de stratégies alternatives telles que le biocontrôle ou l'agroécologie.

5.2. Lutte mécanique

Les moyens de lutte mécanique sont nombreux. Citons simplement la fauche, l'arrachage, le pâturage, le roulage, le hersage, l'eau chaude... sans oublier les techniques de travail du sol au cours de la rotation. Leur efficacité dépend de l'adventice considérée mais aussi de la manière de procéder (NouveauKnoden, 2024).

5.3. Lutte physique

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

5.4. Lutte intégrée

La lutte intégrée est une stratégie basée sur l'expérimentation et l'observation qui permet de contrôler les cultures en harmonie avec leur environnement. Elle prend en considération toutes les méthodes disponibles de protection des plantes (mécaniques, chimiques et biologiques) (Adli, 2017). Elle se caractérise par une action de lutte contre les organismes ravageurs (oiseaux, rongeurs, acariens, insectes, champignons, bactéries, Virus), en utilisant tous les moyens possibles et compatibles entre eux afin de les maintenir sous un seuil économique acceptable (Firlej et Vanoosthuyse, 2001), elle permet de réduire au maximum les risques pour la santé humaine et l'environnement (Guyader, 2020) et assurer la rentabilité et la viabilité de l'agriculture commerciale à long terme (Meyer, 2003).

Ce travail a été effectué au sein du laboratoire de Maîtrise des Énergies Renouvelables équipe « Biomasse et Environnement » de l'Université Abderrahmane Mira de Bejaïa, durant la période allant du mois de Février jusqu'au mois de Mai 2025. La partie pratique s'est déroulée en trois étapes:

- ❖ Prélèvement, isolement et purification des isolats bactériens obtenus à partir des échantillons d'eau de puits à usage agricole dans le but de tester leur pouvoir antifongique.
- ❖ Sélection *in vitro* des isolats ayant montré un effet antifongique positif (confrontation directe et production de substances volatiles) et d'importance agricole.
- ❖ Tester sur un organe détaché (fruits de tomate) la capacité des meilleurs isolats à inhiber la pourriture causée par *Aspergillus niger*.

1. Matériel

1.1. Matériel biologique

Les souches fongiques cibles testées dans cette présente étude appartiennent à trois genres de champignons phytopathogènes à savoir: *Aspergillus niger*, *Penicillium* sp et *Fusarium* sp. Ils sont fournies par le Laboratoire de Maîtrise des Énergies Renouvelables équipe « Biomasse et Environnement » de l'université Abderrahmane Mira de Bejaïa.

1.2. Matériel non biologique

Les milieux de culture, solutions et réactifs ainsi que l'appareillage utilisés dans cette étude sont cités en annexes I, II et III respectivement.

2. Méthodes

2.1. Prélèvement des échantillons d'eau de puits

Afin de rechercher les bactéries qui produisent des molécules antifongiques contre les 3 champignons phytopathogènes mentionnés précédemment (*Aspergillus niger*, *Penicillium* sp et *Fusarium* sp), deux prélèvements sont effectués en toute asepsie à partir des eaux douces (puits) du village Djebira- Béjaia- (36°41'59.2 »N 5°04'28.8 »E) en mois de Février de l'année en cours. Le puits est utilisé à des fins agricoles, situé à la base d'une montagne recevant les flux des eaux de ruissellement en période d'hiver, et n'a pas été entretenu

pendant plusieurs années. Les échantillons sont prélevés à l'aide d'un récipient désinfecté à l'eau de javel et sont mis dans des flacons stériles en verre puis transportés au moyen d'une glacière (4°C) le jour même au laboratoire. La figure suivante illustre l'endroit du prélèvement et sa position géographique.

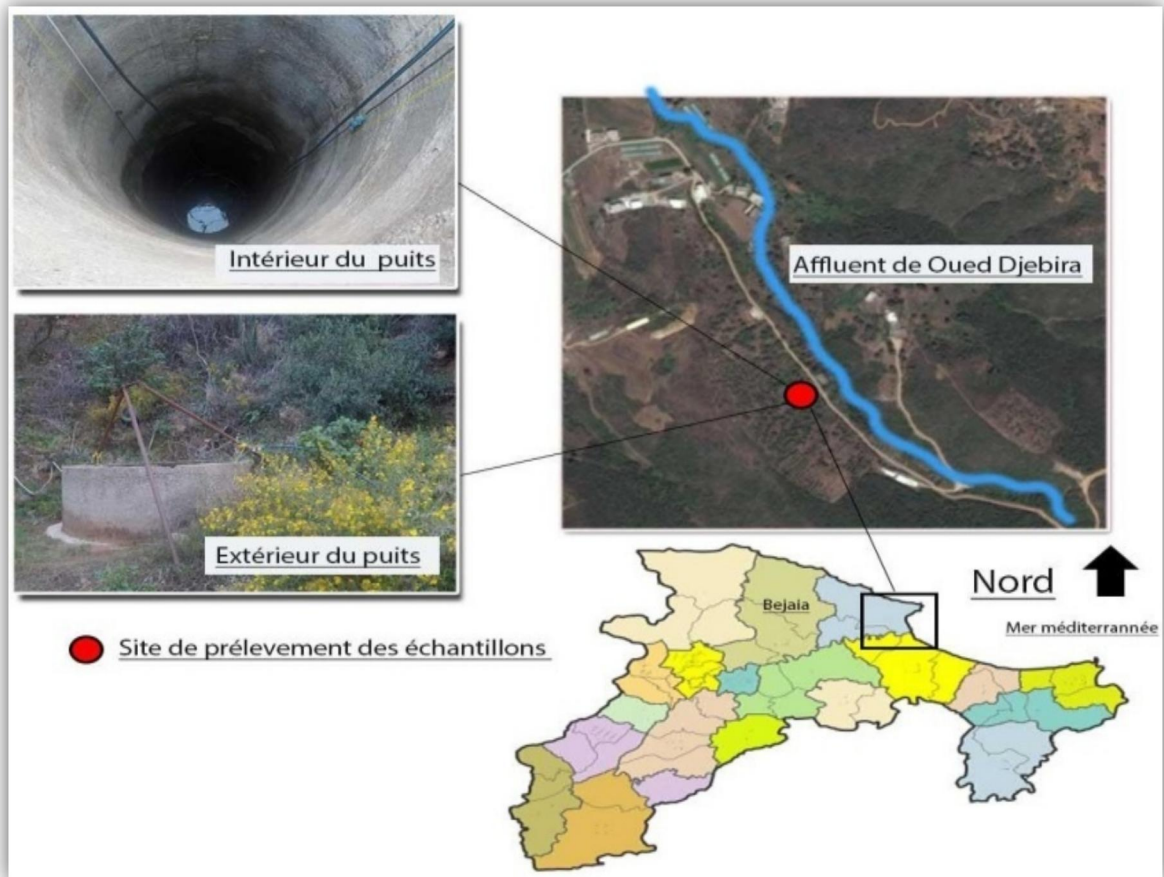


Figure N° 04: Site de prélèvement de séchantillons d'eau de puits.

2.2. Isolement et purification des bactéries

Une série de dilutions décimales allant jusqu'à 10^{-2} est réalisée à partir de la solution mère (10 ml d'eau de puits), 1ml de chaque dilution estensemencé par inondation sur milieu (PCA) Plate Count Agar (annexe I). Les boîtes sont incubées à 30°C pendant 24h à 72h. Après incubation, toutes les colonies apparaissant différentes phénotypiquement (taille, couleur, forme, pigmentation diffuse et aspect...) sont repiquées séparément sur milieu PCA vierge, par la suite des repiquages successifs sont effectués sur le même milieu d'isolement jusqu'à l'obtention des colonies pures (Voir figure N° : 05).

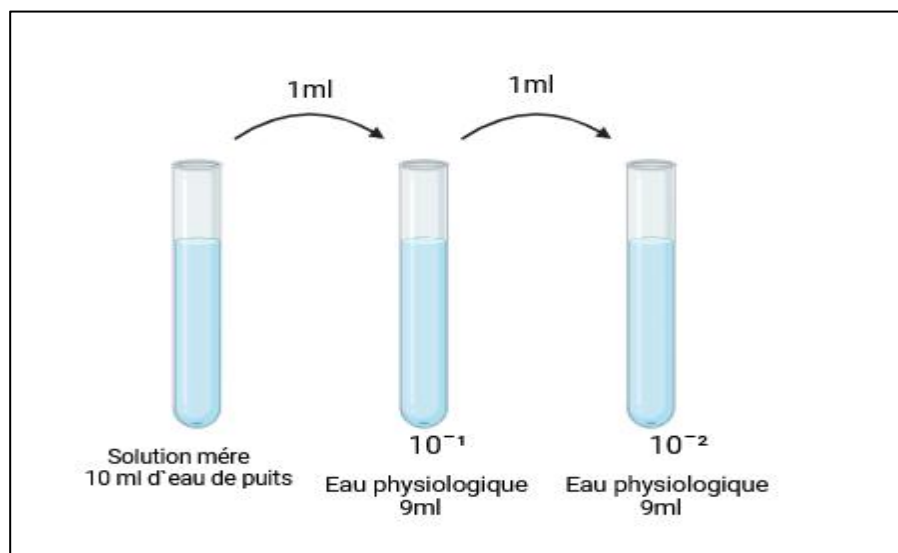


Figure N° 05: Les dilutions décimales préparées.

Sur la figure 6 sont illustrées toutes les démarches suivies lors de la sélection des isolats bactériens de l'étape de prélèvement jusqu'au test *in vivo*.

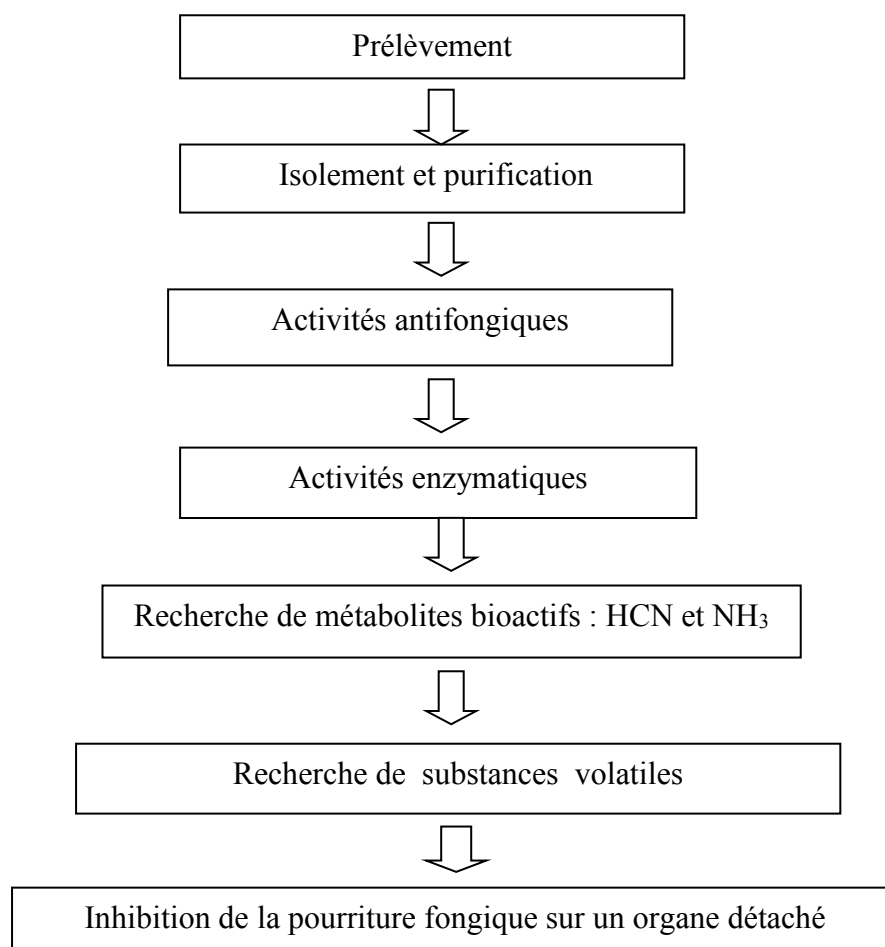


Figure N° 06 : Etapes suivies lors de la sélection des isolats bactériens.

2.3. Mise en évidence de l'activité antifongique

2.3.1. Repiquage des souches fongiques

A l'aide d'un écouvillon, les spores fongiques sont ensemencées en stries serrées sur milieu PDA (annexe I). L'incubation est effectuée à 25°C jusqu'à apparition claire d'un mycélium. (Voir figure N°:7).



Figure N° 07: Aspect des espèces fongiques sur milieu PDA.

2.3.2. Repiquage des isolats bactériens

Avec une pipette pasteur stérile, ôter, une colonie bactérienne et l'ensemencer en stries sur milieu PCA. L'incubation est effectuée à 30°C pendant 24 à 48h afin d'obtenir des cultures jeunes.

Des précultures sont préparées sur bouillon nutritif pour le test d'antagonisme.

2.3.3. Effet antagoniste des isolats bactériens à l'égard des trois champignons par confrontation directe sur boîte

Les isolats bactériens sont soumis au test d'antagonisme sur gélose TSA (annexe I) à l'égard des trois souches fongiques : *Aspergillus niger*, *Penecillium sp* et *Fusarium sp*, en présence de boîtes témoins.

Le test consiste à placer un disque de gélose de 5mm de diamètre d'une culture fongique jeune au centre de la boîte de Pétri contenant le milieu TSA. 10µL de deux cultures bactériennes jeunes sont déposés à une distance de 1cm de la périphérie de la boîte de Pétri, avec deux répétitions de chaque culture séparément dans la même boîte.

Des témoins négatifs sont préparés en parallèle pour chaque champignon en déposant un disque fongique au centre des boîtes dépourvues de bactéries. L'incubation est réalisée à 25°C, les boîtes sont observées quotidiennement jusqu'à ce que le mycélium fongique atteigne la périphérie de la boîte témoin. La capacité de chaque isolat bactérien à inhiber la croissance mycélienne est déterminée en calculant le pourcentage d'inhibition de la croissance (PGI%) selon la formule suivante :

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

KR: La distance en mm entre le point d'inoculation du champignon et la marge de mycelium contenue dans la boîte témoin.

R1: La distance en mm entre le point d'inoculation du champignon phytopathogène et la marge de la colonie contenue dans la boîte teste.

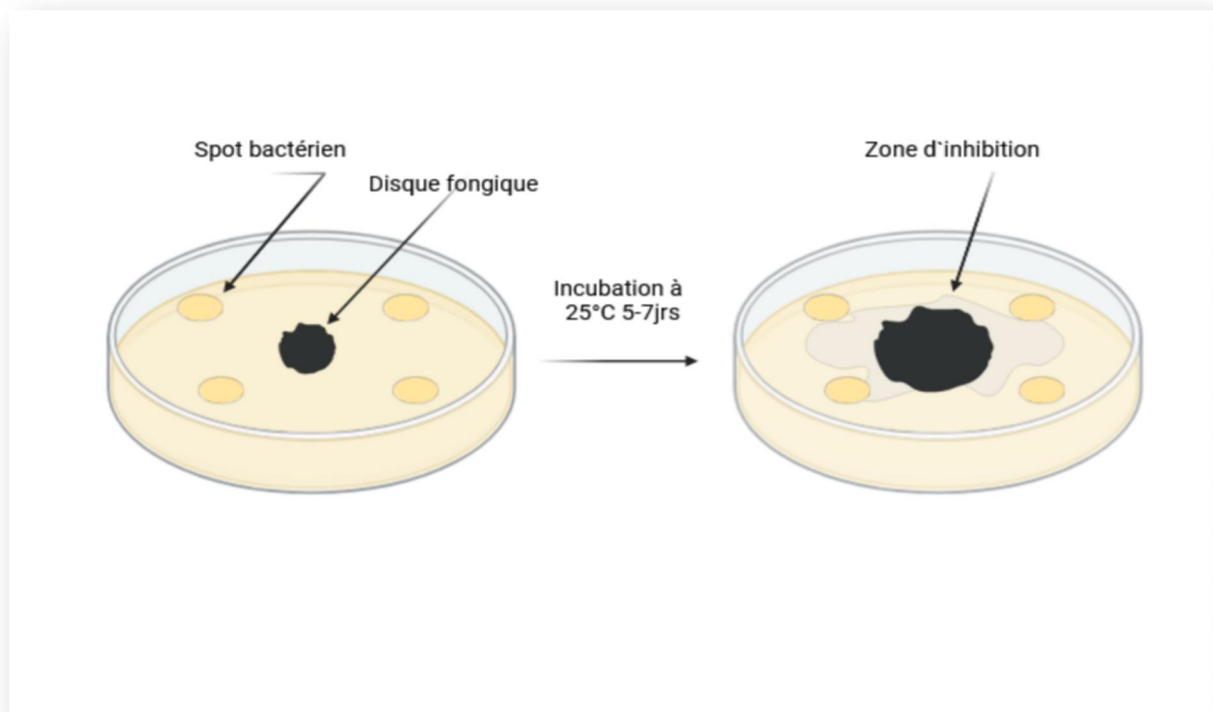


Figure N° 08: Test d'antagonisme des isolats bactériens à l'égard des champignons phytopathogènes.

2.4. Caractérisation métabolique et fonctionnelle

2.4.1. Activités enzymatiques

Afin de déterminer la capacité des isolats bactériens à fertiliser le sol et lutter contre les champignons phytopathogènes, différentes enzymes ont été recherchées.

2.4.1.1. Activité protéasique

Le milieu de culture renferme (en g/l): caséine pancréatique (5); extrait de levure (2,5) ; glucose (1) et Agar (15). Le milieu est ajusté à pH 7 et autoclavé 20 minutes à 120°C. Parallèlement, 100 ml d'une solution de lait écrémé stérilisé à 10% est préparée et ajoutée au milieu. Les isolats bactériens sont ensemencés par spots. L'incubation est réalisée à 30°C 24-48H.

Le principe du test d'activité enzymatique des protéases repose sur la capacité de ces enzymes à hydrolyser les liaisons peptidiques des protéines, les transformant en peptides plus petits ou en acides aminés libres. L'activité protéasique est traduite par l'apparition d'un halo transparent autour des spots (Bach et Munch, 2000). (Voir figure N° : 09).

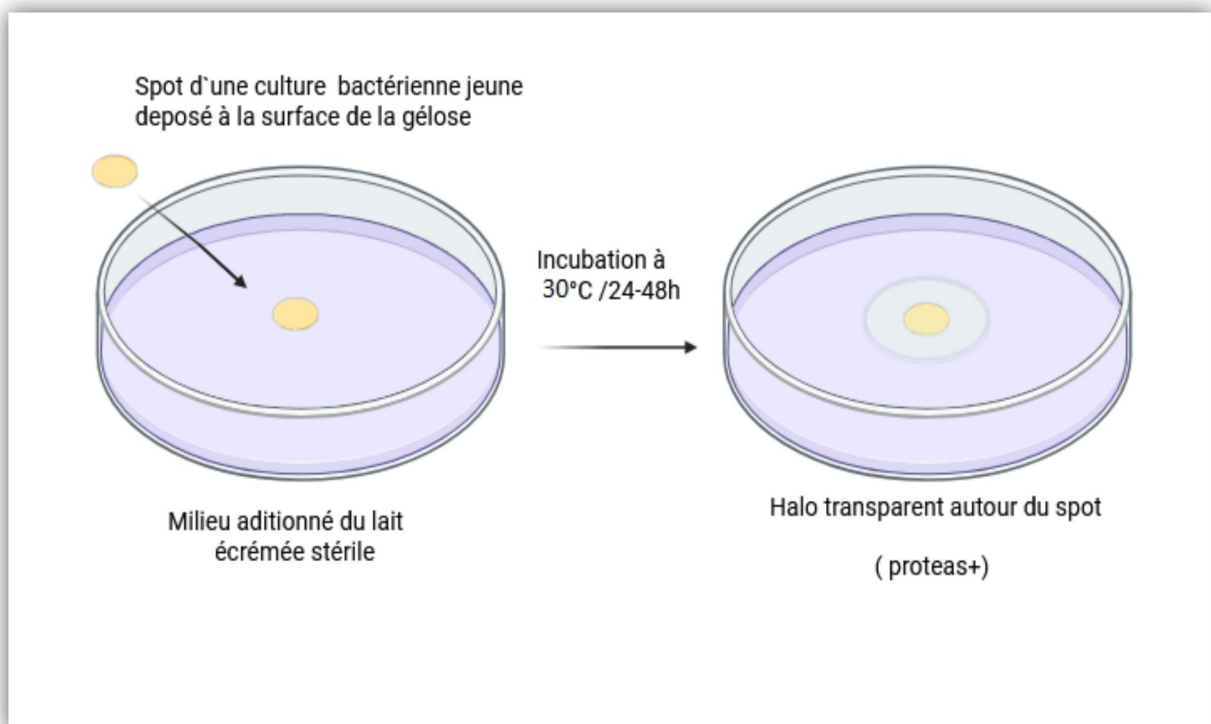


Figure N° 09: Recherche de la production de protéase.

2.4.1.2. Activité uréasique

Pour préparer le milieu, à 950ml d'H₂O : Peptone (1g), Glucose (1g), NaCl (5g), Na₂HPO₄ (1.2g), KH₂PO₄ (0,8g), rouge de phénol (0,012g) et (15g) d'agar sont ajoutés. Le pH du milieu est ajusté à 6,8 puis ce dernier est autoclavé 20 minutes à 120 ° C, 50 ml d'une solution d'urée à 40% préalablement filtrée (0.22µm) sont ajoutés. Enfin le milieu est coulé en boîtes de Pétri.

Le principe de l'activité de l'uréase repose sur la capacité de cette enzyme à hydrolyser l'urée en produisant de l'ammoniac (NH₃) et du dioxyde de carbone (CO₂). Cette réaction provoque une augmentation du pH du milieu, ce qui peut être détecté facilement à l'aide d'un indicateur coloré. L'activité uréasique est traduite par l'apparition d'un halo rose autour des spots (Christensen ; 1946). (Voir figure N° : 10).

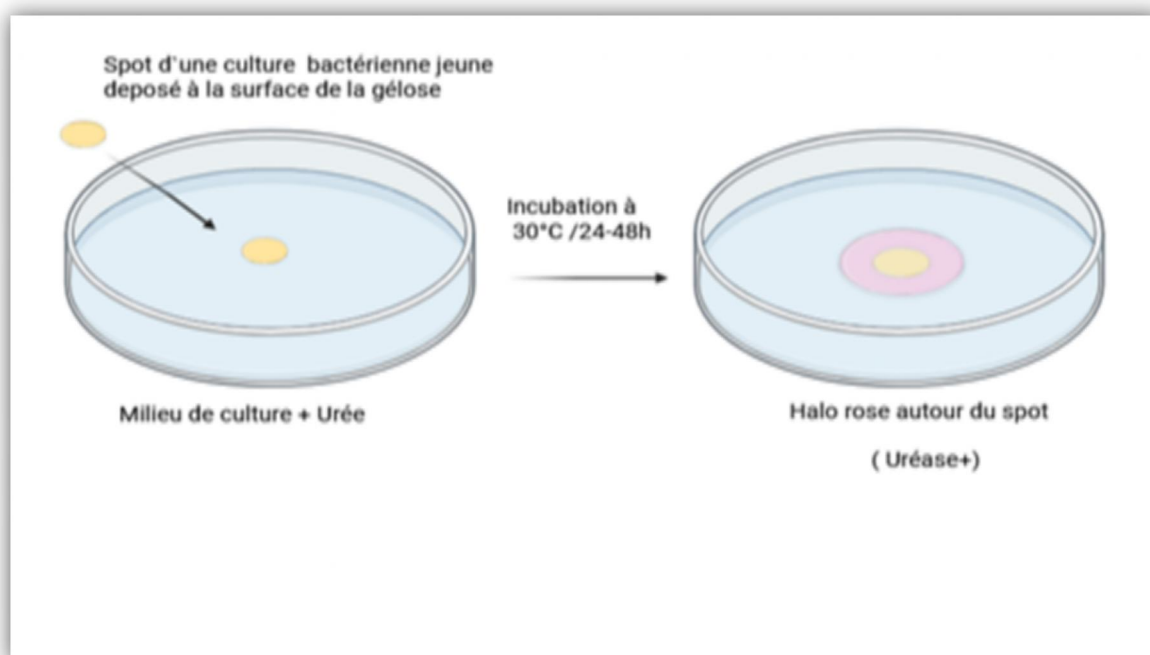


Figure N° 10: Recherche de l'activité uréasique.

2.4.1.3. Activité estérasique et lipasique

Ces activités sont recherchées sur le milieu de culture décrit par Sierra (1957) qui contient en g/L : peptone (10); NaCl(5); CaCl₂H₂O (0.1); Agar(18); le tween 80 (1%, v/v) est ajouté pour révéler l'activité estératique, alors que le tween 20 est utilisé pour mettre en évidence l'activité lipolytique. Le pH est ajusté à 7,4 et autoclavé 20 minutes à 120°C. Après dépôt des spots, les boîtes sont incubées pendant 48h. (Carrim et al., 2006).

Les lipases sont des enzymes qui hydrolysent les lipides (triglycérides) en acides gras libres et glycérol, ce qui peut être détecté par un changement de turbidité, de couleur ou de pH dans un milieu contenant des lipides. Le test d'activité des lipases repose donc sur la détection de cette hydrolyse.

L'estérase hydrolyse les esters en acide et alcool. Le test détecte cette réaction par changement de pH, formation de précipité, ou libération d'un composé coloré.

La présence d'une activité est traduite par l'apparition d'une zone opaque autour des colonies. (Voir figure N°: 11).

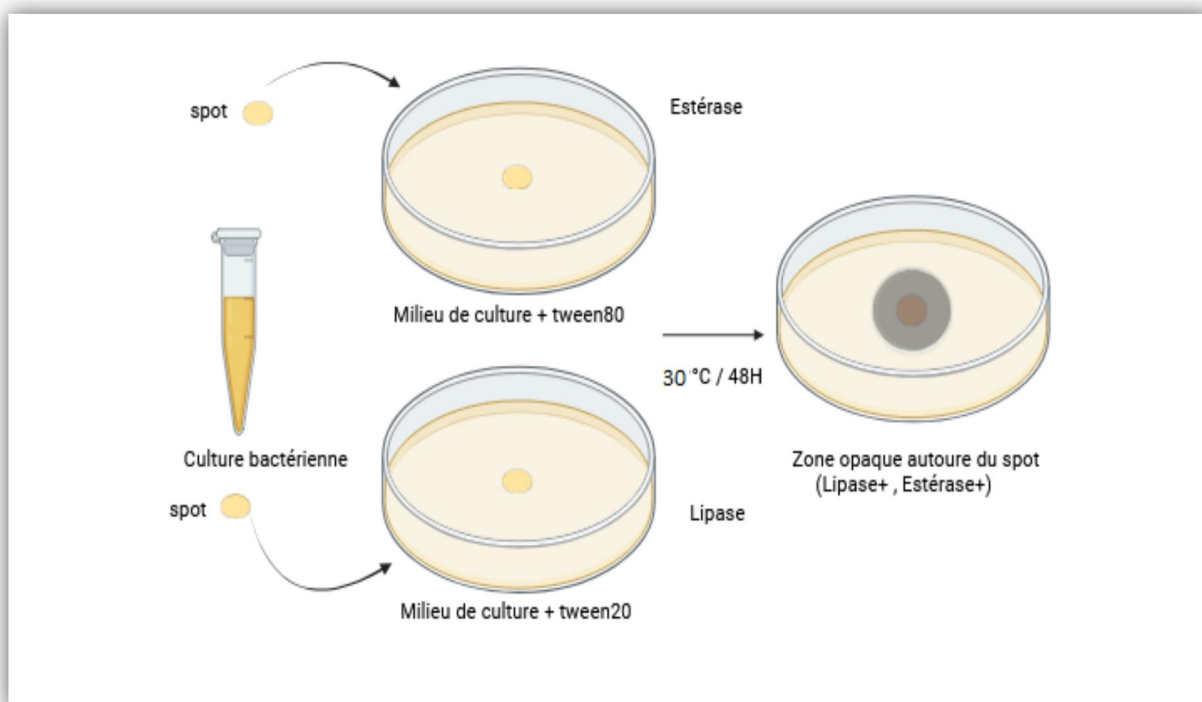


Figure N° 11: Recherches des deux activités estérasiqque et lipasique.

2.4.1.4. Activité amylasique

Le test d'activité amylasique est réalisé sur gélose à base d'amidon. Le milieu contient en (g/l): KNO_3 (0,5), K_2HPO_4 (1,0), MgSO_4 (0,2), CaCl_2 (0,1), FeCl_3 (0,001), amidon soluble (10), agar (15) et eau distillée 1000 ml. Le pH du milieu est ajusté à 7,2 puis ce dernier est autoclavé à $120^\circ\text{C}/20\text{mn}$. Une solution de lugol (révélateur) est préparée comme suit: 1g d'iode cristallin, 2g de KI et 300ml d'eau distillée. Le tout est mélangé et laissé au repos puis filtré. Les boîtesensemencées sont incubées à $30^\circ\text{C}/48-72\text{H}$, la solution de lugol préalablement préparée est éparpillée sur toute la surface du milieu, après quelques minutes

de contact, l'excès est éliminé et les boîtes sont lavées à l'eau distillée, enfin la lecture est effectuée de la manière suivante:

Les amylases sont des enzymes qui hydrolysent les liaisons glycosidiques des polysaccharides comme l'amidon, en les transformant en sucres simples ou en dextrines. Une activité amylasique positive est traduite par la présence d'un halo claire autour des colonies (Voir figure N° : 12).

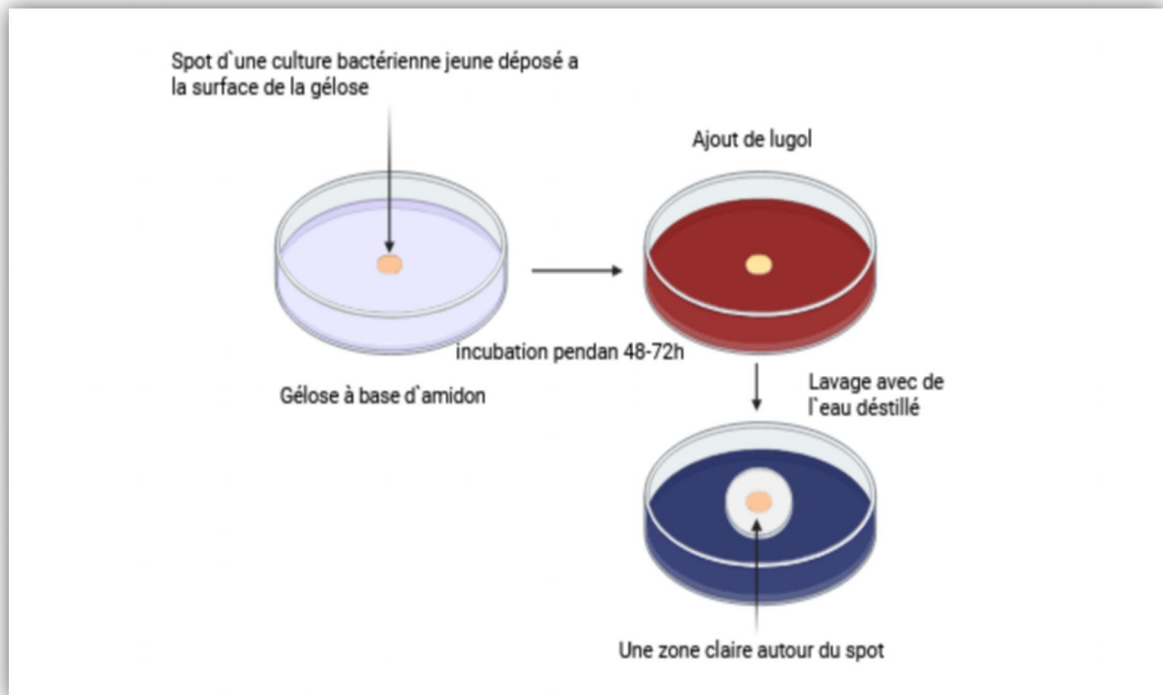


Figure N° 12: Recherche de l'activité amylasique.

2.4.1.5. Activité cellulasique

On recherche l'activité cellulasique sur le milieu de Carder (1986), qui contient en g/l: Na_2HPO_4 (6); KH_2PO_4 (3); NaCl (0,5); NH_4Cl (1); extraits de levure (3); CMC (carboxyméthyl-cellulose) (5) et Agar (15). Le pH du milieu est ajusté à 7,2 puis ce dernier est autoclavé à $120^\circ\text{C}/20\text{mn}$. Les boîtes ensemencées sont incubées à $30^\circ\text{C}/7$ jours. La surface des boîtes est inondée avec une solution de rouge Congo (1%) (Nermeen et al., 2010), après 15 min, la surface est lavée avec une solution de NaCl 1M, et les boîtes sont laissées au repos une nuit (Jaradat et al., 2008).

Les cellulases sont des enzymes qui hydrolysent la cellulose, un polysaccharide constitué de chaînes de glucose liées par des liaisons β -1,4. Elles dégradent la cellulose en cellobiose, glucose ou oligosaccharides. Après coloration (rouge Congo), l'activité cellulasique se traduit par l'apparition d'un halo clair autour des colonies. (Voir figure N°: 13).

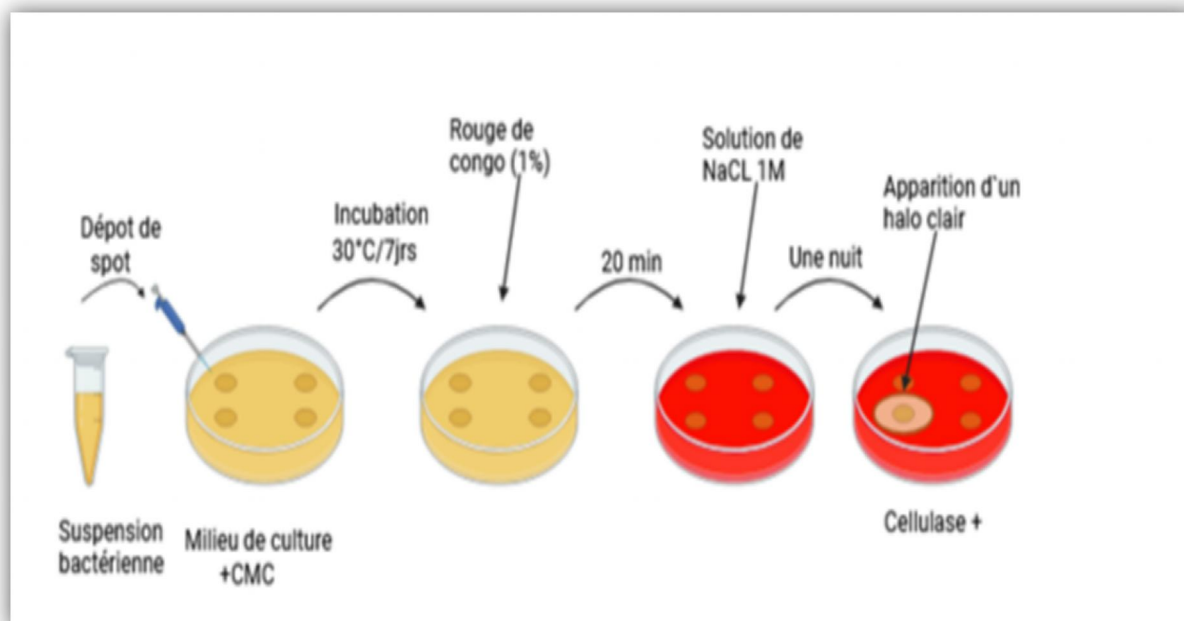


Figure N° 13 : Recherche de l'activité cellulasique.

2.4.2. Recherche de métabolites bioactifs antifongiques

2.4.2.1 Production de cyanure d'hydrogène (HCN)

La recherche de la production d'HCN est réalisée en ensemençant les isolats bactériens sur gélose nutritive (GN) additionnée de la glycine (4.4 g/l). Un disque de papier Wattman imprégné d'une solution de picrate de sodium (5%) d'acide picrique et 2% decarbonate desodium anhydre) est déposé au fond du couvercle des boîtes. Ces dernières sont refermées puis scellées avec du parafilm. La lecture du test s'effectue après incubation à 30°C pendant 96h (Lorck, 1948).

La production d'HCN se fait à partir de la glycine, un acide aminé riche en azote, grâce à une enzyme appelée HCN synthase et un résultat positif se traduit par une variation de la couleur du papier Wattman du jaune vers l'orange, marron, à marron rougeâtre. (Voir figure N° : 14).

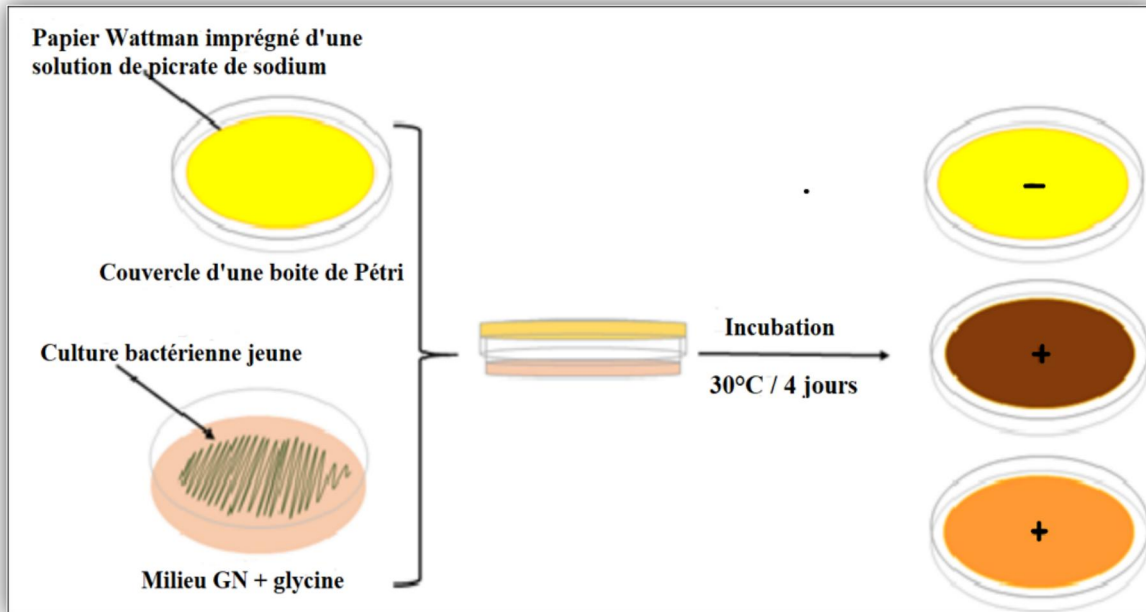


Figure N° 14 : Production de cyanure d'hydrogène (HCN).

2.4.2.2. Production d'ammoniac (NH₃)

Les isolats bactériens sont testés pour leur capacité à produire de l'ammoniac dans l'eau peptonée. Des colonies d'une culture bactérienne jeune sont inoculées dans 1ml d'eau peptonée, puis incubées à 30°C pendant 4 jours. La lecture du test se fait par l'ajout de 25µl du réactif de Nessler dans chaque tube.

La production d'ammoniac est un critère de sélection important pour identifier des bactéries à potentiel antifongique, car elle reflète leur capacité à inhiber indirectement les champignons phytopathogènes par modification du pH du milieu. Le développement instantané d'une couleur jaune, orange ou brune indique une production d'ammoniac (Cappuccino et Sherman, 1992). Des tubes témoins sont préparés en parallèle enduplicata. (Voir figure N° : 15).

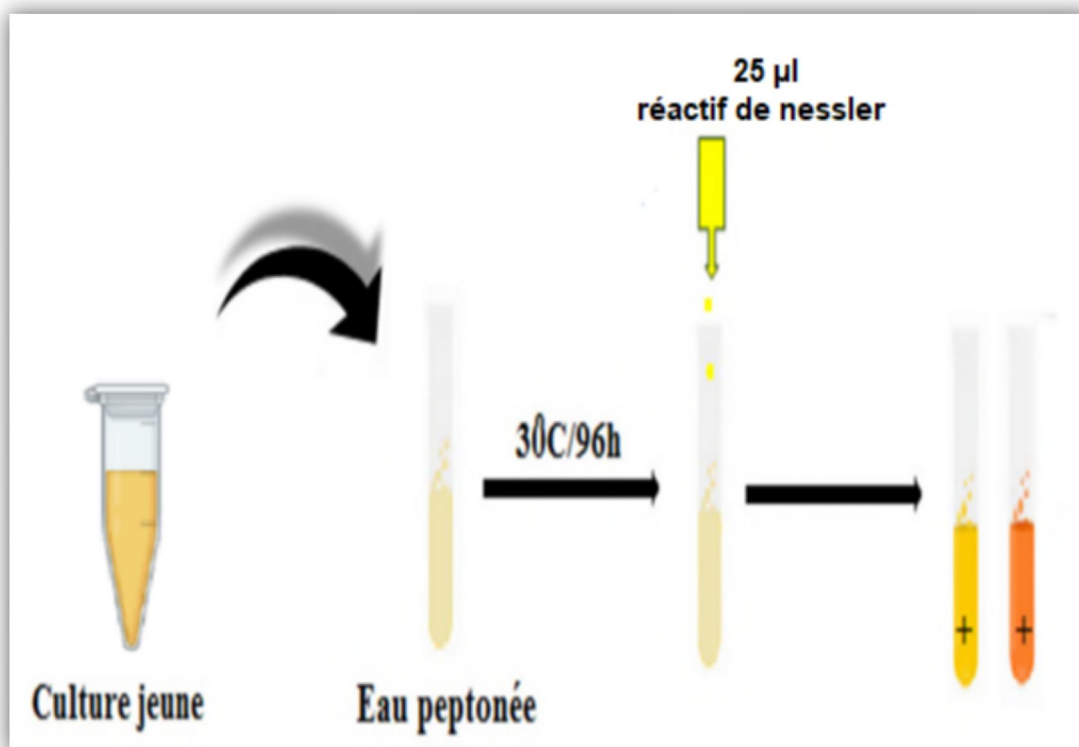


Figure N° 15: Production d'ammoniac (NH_3).

3. D'autres molécules antifongiques volatiles

La recherche d'une substance volatile probablement produite par ces isolats bactériens inhibant la croissance d'*Aspergillus niger* a été réalisée selon la méthode de Camporota (1985). Un disque fongique prélevé à partir d'une culture jeune d'*Aspergillus niger* est déposé au centre d'une boîte de pétri contenant le milieu PDA. Une autre boîte contenant le milieu TSA estensemencée par stries avec l'isolat antagoniste. Les couvercles des deux boîtes sont enlevés stérilement et ces dernières sont placées l'une en face de l'autre et scellées par une bande de parafilm d'une façon à éviter toute perte de substances volatiles. Deux boîtes inoculées uniquement avec un disque du pathogène fongique et deux autres contenant du TSA vierge sont préparées comme précédemment pour servir de témoin, l'incubation est réalisée à 25°C pendant 5 à 7 jours. Ce test est réalisé en duplicata. L'effet des substances volatiles est évalué après estimation de la croissance mycélienne en présence des isolats, ainsi que la présence ou non de spores en comparant au témoin. L'inhibition de la croissance

mycélienne est calculée suivant la formule ci-après (Trivedi et al., 2008).

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

KR : La distance en mm entre le point d'inoculation du champignon et la marge du mycélium contenu dans la boîte témoin.

R1 : La distance en mm entre le point d'inoculation du champignon phytopathogène et la marge du mycélium contenu dans la boîte teste.

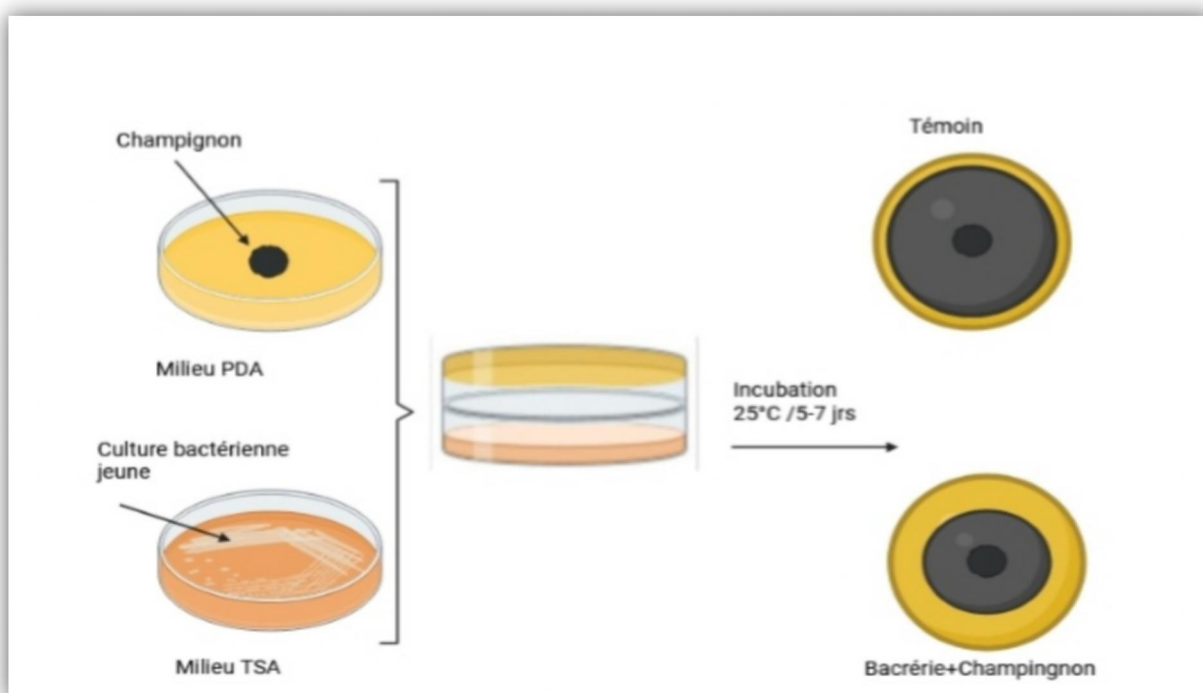
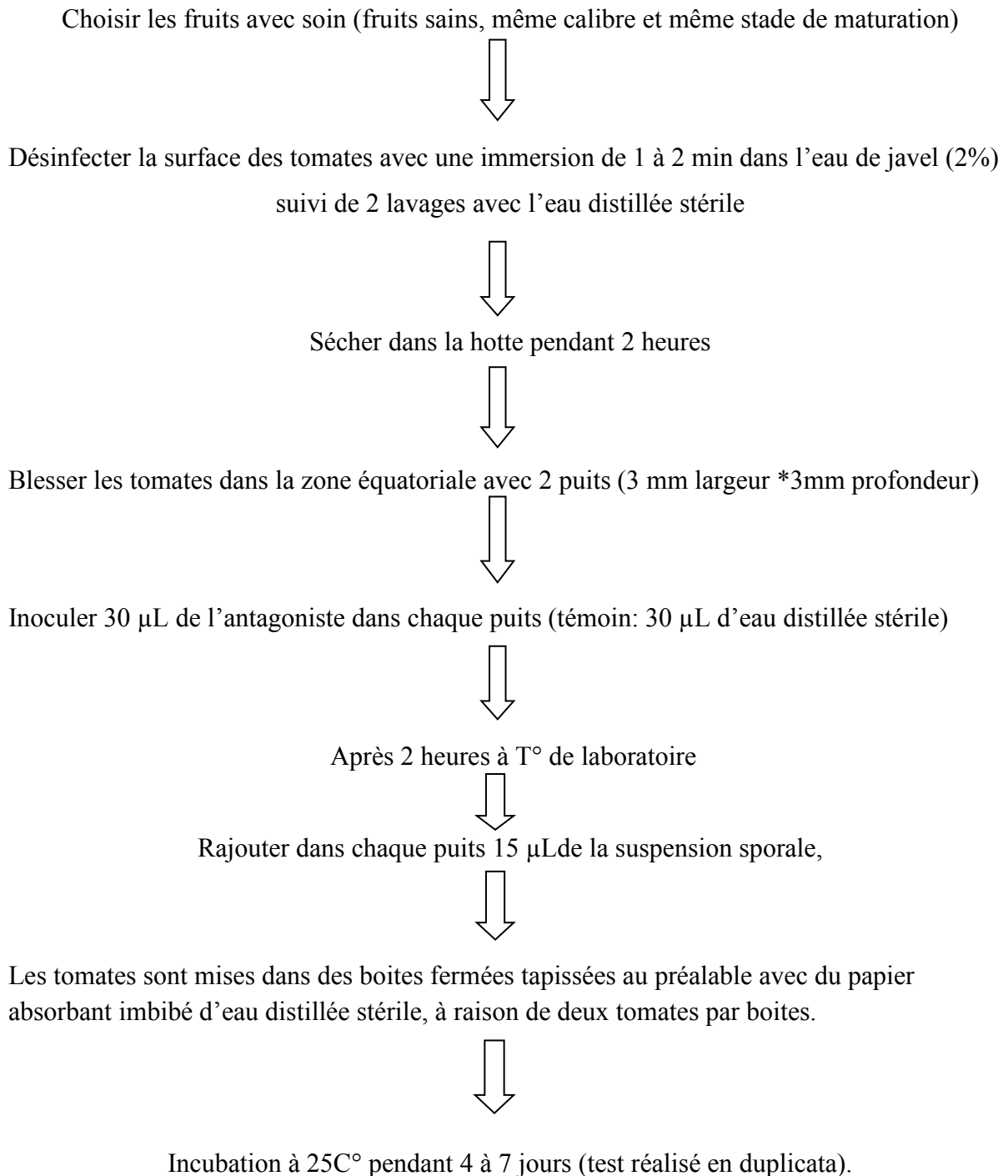


Figure N° 16: Production de molécules antifongiques volatiles.

4. Inhibition de la pourriture noire d'*Aspergillus niger* sur les fruits de tomate

Les isolats (A1 et A2) ayant montré une meilleure activité antagoniste à l'égard d'*Aspergillus niger* sur boîte, sont utilisés dans ce test.

Les différentes étapes suivies pour réaliser ce test sont représentées ci-dessous :



La lecture est faite en notant l'intensité de la pourriture causée aux alentours des puits inoculés et la quantité du mycélium et de spores produites dans les fruits tests et témoins. (Voir figure N° 17).

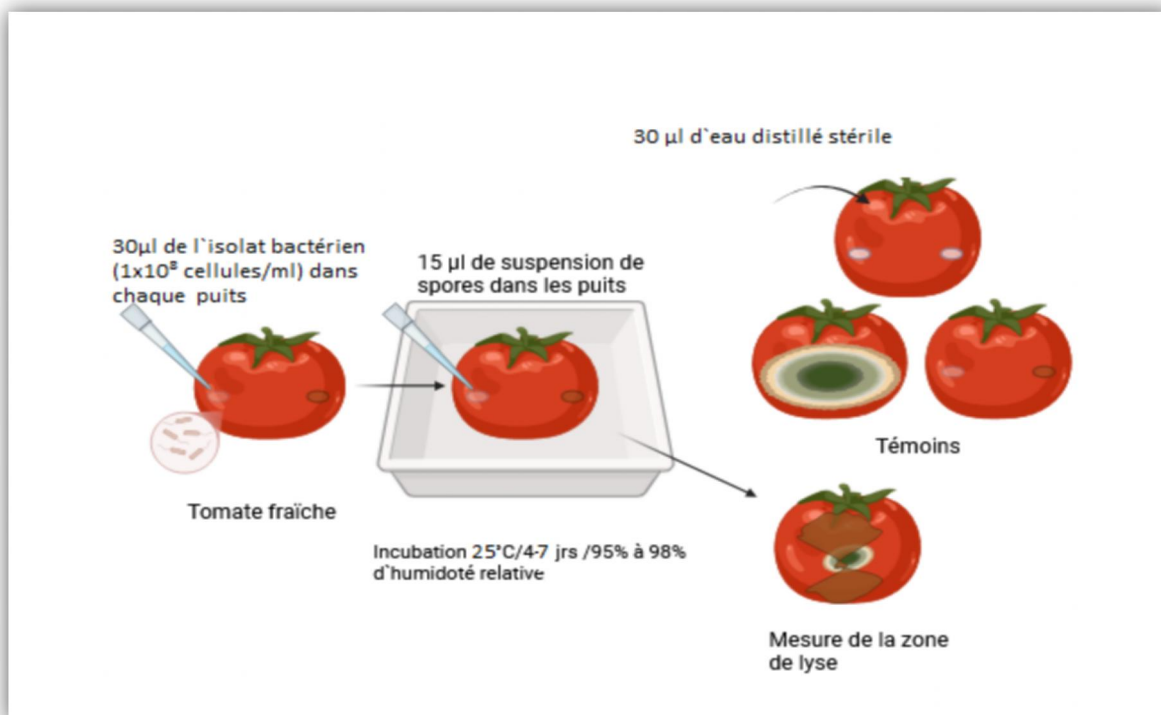


Figure N° 17: Inhibition de la pourriture noire d'*Aspergillus niger* sur fruits de tomate.

5. Analyse statistique

Une analyse de variance (ANOVA) est effectuée en utilisant le logiciel GraphPad Prism^R version 6.01. Si des différences significatives sont détectées, un test de comparaison multiple des moyennes (LSD) est effectué.

Au cours du temps, les experts et les agriculteurs ont développé de nombreuses pratiques pour limiter l'expansion et les dégâts causés par les différentes espèces phytopathogènes, et par conséquent accroître la quantité et améliorer la qualité de la production des végétaux (Rouag, 2017). Les agents de biocontrôle présentent un grand intérêt scientifique et agronomique grâce à leur rôle important dans le développement des cultures. Plusieurs articles ont été publiés sur les agents de biocontrôle et leur impact sur la protection et la stimulation de la croissance des plantes (Islam et Hossain, 2013). Actuellement, plusieurs microorganismes sont commercialisés et utilisés dans le monde (Savita et al., 2019).

1. Prélèvement d'échantillons d'eau et isolement de bactéries

A partir des deux échantillons d'eau prélevés du puits à usage agricole situé au village Djebira, l'aspect morphologique des colonies sur le milieu d'isolement PCA a révélé une grande diversité (taille, forme, surface couleur et pigmentation diffuse) après incubation à 30°C/ 24 à 72H. 29 colonies différentes sont apparues à l'œil nu, ces dernières sont repiquées et purifiées sur milieu PCA vierge, et conservées pour les tests ultérieurs.

2. Mise en évidence de l'activité antifongique

Les 29 isolats bactériens ont fait l'objet d'un test d'antagonisme par confrontation directe sur milieu TSA à l'égard de trois champignons phytopathogènes à savoir : *Aspergillus niger*, *Fusarium* sp et *Penicillium* sp. Après 7 jours d'incubation en présence de boîtes témoins, l'activité antifongique *in vitro* a révélé une action inhibitrice variable envers les champignons testés. La mesure des diamètres des zones d'inhibition a permis de calculer les PGI% pour les trois champignons cibles qui varient selon les isolats bactériens. Les résultats des PGI% obtenus à l'égard des trois champignons par les 29 isolats sont représentés dans la figure 18.

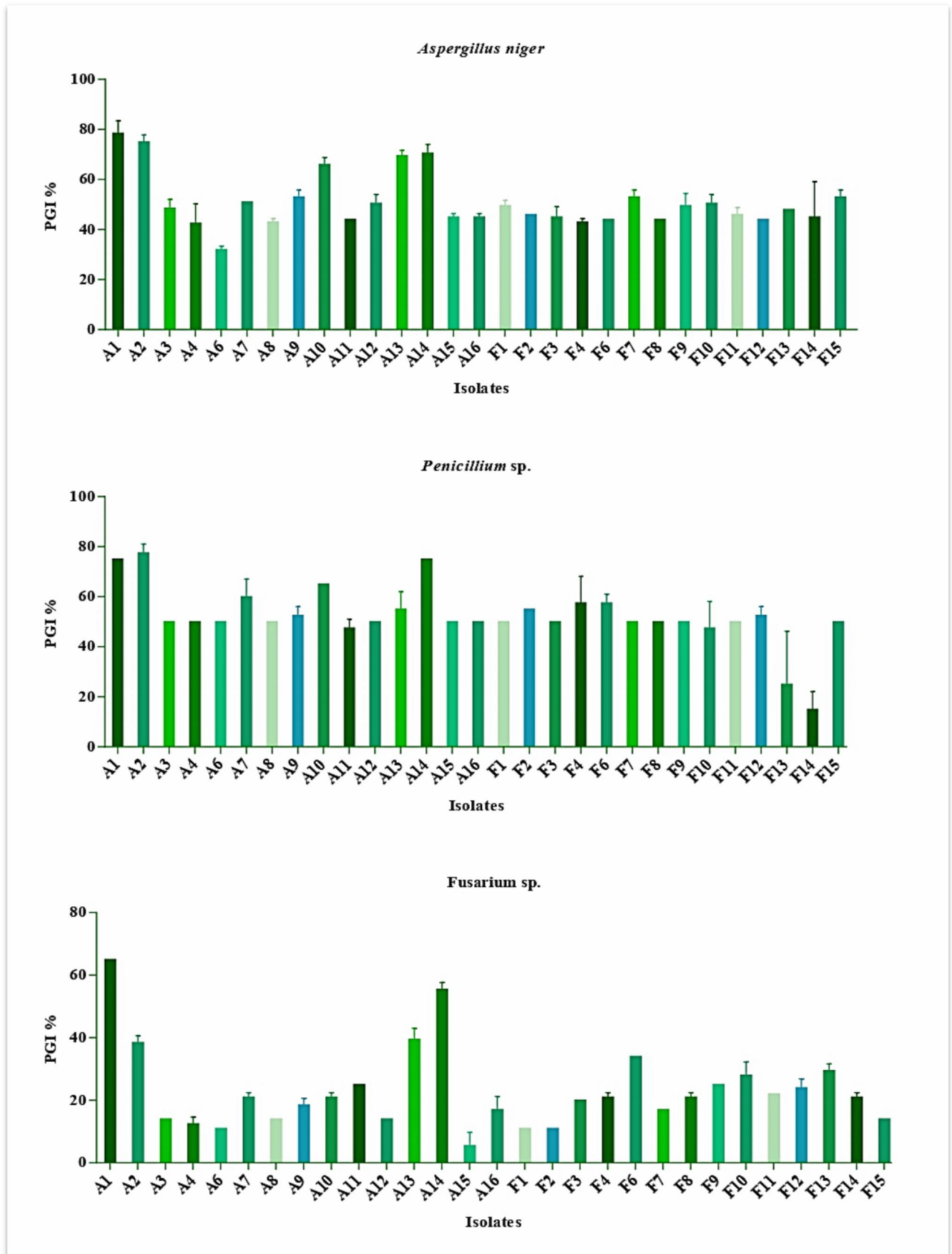


Figure N° 18: Pourcentages d'inhibition de la croissance des trois champignons par les 29 isolats bactériens testés.

Quelques résultats du test de confrontation sur boîte sont illustrés sur la figure 19.

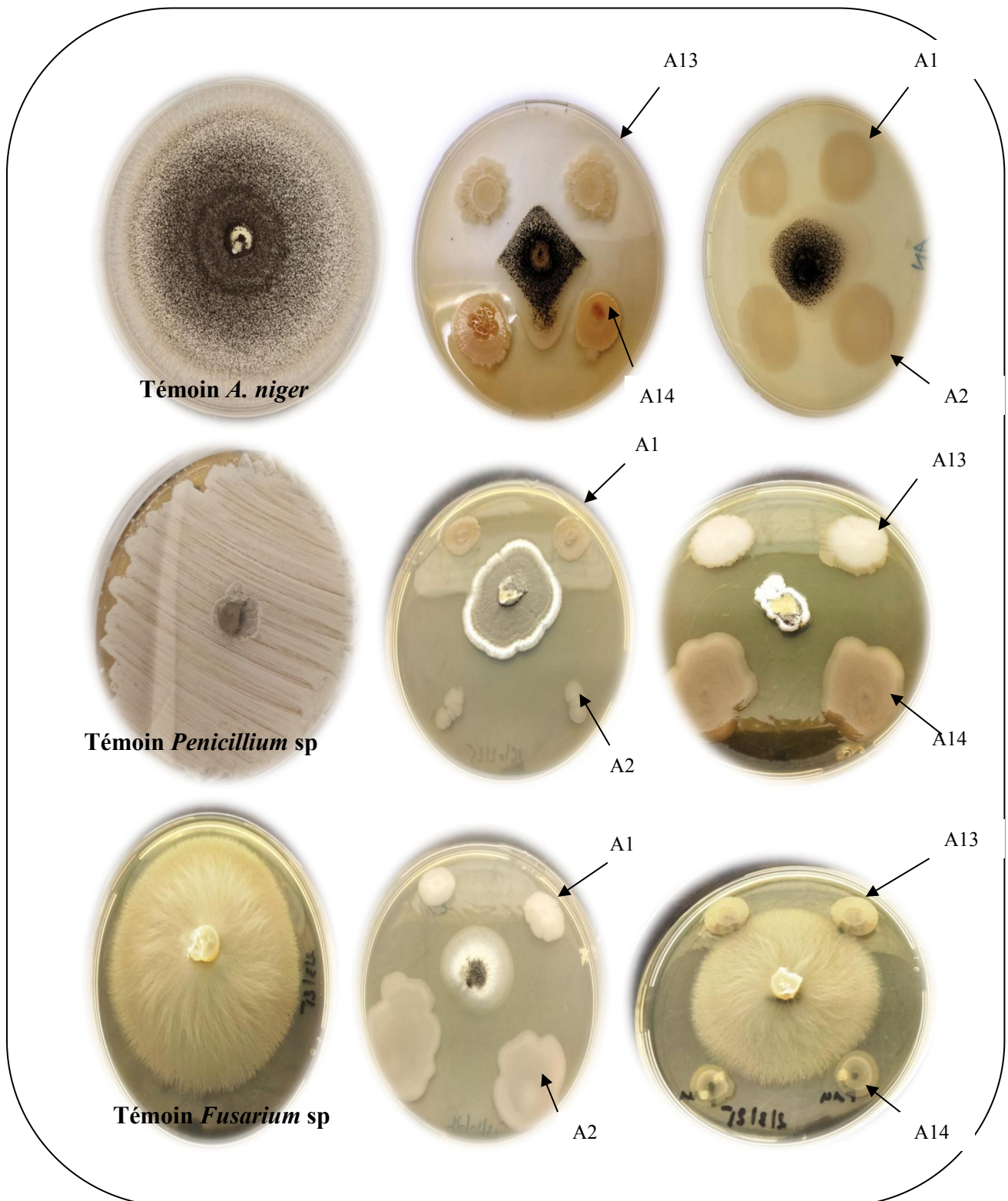


Figure N°19: Effet antagoniste de quelques isolats sur les trois champignons phytopathogènes testés.

Les isolats bactériens ont montré un spectre d'action variable *vis-à-vis* d'*Aspergillus niger* avec des PGI allant de 32% à 78.5%, à noter que, les bactéries antagonistes les plus efficaces sont : A1 et A2 avec des pourcentages d'inhibition de $78,5\% \pm 0.049$ et $75\% \pm 0.028$ respectivement, suivi des isolats A14 et A13 avec des valeurs PGI de $70,5\% \pm 0.00$ et $69,5\% \pm 0.022$ respectivement.

D'une manière similaire pour *Penicillium*, l'activité antagoniste varie d'un isolat à l'autre. Quelques isolats montrent des taux élevés tels que : A2, A1 et A14 avec des pourcentages d'inhibition de $77,5\% \pm 0.035$, $75\% \pm 0.00$ et $75\% \pm 0.00$ respectivement, suivi des isolats A7 et A10 avec des PGI de 65% et 60%, tandis que d'autre sont moins efficaces.

L'inhibition de la croissance est globalement faible dans le cas de *Fusarium* sp. Le meilleur isolat est A1 avec une valeur de PGI enregistrée de $65\% \pm 0.00$ suivi du pré par l'isolat A4 qui a montré une réduction de la croissance mycélienne avec une valeur de $55,5\% \pm 0.014$. Pour les 27 isolats restants, les pourcentages enregistrés pour l'inhibition de la croissance sont dans l'intervalle de 6% à 39,5%.

Les deux champignons *Aspergillus niger* et *Penicillium* sp sont globalement plus sensibles à l'effet des métabolites produits par les isolats bactériens testés avec un pourcentage d'inhibition maximum qui s'approche de 80% en comparant à *Fusarium* sp avec une valeur maximale de PGI ne dépassant pas les 65%. Le test de confrontation directe sur boîte a permis de sélectionner plusieurs isolats bactériens, en particulier A1, A2 et A14, capables d'inhiber fortement la croissance de ces trois champignons phytopathogènes.

L'étude des activités antifongiques et promotrices de croissance des isolats bactériens sélectionnés est mise en évidence *in vitro* par la mesure de diamètre d'inhibition de la croissance mycélienne formée autour de disque fongique inoculé sur le milieu de culture PDA (Swain et Ray, 2009).

Les résultats obtenus sur *Aspergillus niger* corroborent avec ceux obtenus par Bensidhoum et al., (2016) ayant trouvé un pourcentage d'inhibition dépassant les 50 %. Des travaux établis par Jemni et al.,(2009); Rai et al., (2016) ont montré une activité antifongique à l'égard d'*Aspergillus niger* avec des pourcentages d'inhibition de 66% et 70% respectivement, qui semblent proche à nos résultats, à la différence de Tabli et al.,(2018), qui ont enregistré un pouvoir d'inhibition de 90% , une valeur largement supérieure à celle notée dans notre travail. Un faible pourcentage d'inhibition à l'égard d'*Aspergillus niger*, est obtenu avec l'isolat A6

(32%). Les isolats bactériens des travaux cités ci-dessus ont été obtenus du même site de prélèvement (puits). Cette variabilité dans les valeurs des PGI% obtenus par les auteurs : Tabli et al., (2018); Bensidhoum et al., (2016) et Rai et al.,(2016) pour les différents isolats du même site du prélèvement peut être expliquée par des variabilités génétiques entre les isolats (ce n'est pas la même bactérie). Elle peut être aussi influencée par l'effet de la saison (puits vide en octobre 2019 et plein en Février 2025). Pour *Penicillium* sp, l'isolat A2 a marqué le meilleur pourcentage d'inhibition (77,5%), tandis que 15 isolats ont montré une activité inhibitrice moyenne aux alentours de (50%) .Ces résultats sont similaires comparés à ceux publiés par Jemni et al., (2010), qui ont obtenus des pourcentages d'inhibition variant entre 50% à 70%. Etebarian et al., (2005) ont présenté dans leur travail, que le résultat de PG Imaximum obtenu à l'égard du même champignon est de 78,5%, leurs résultats sont similaires à ceux obtenus dans la présente étude.

Dans le cas de *Fusarium* sp, seuls les isolats A1 et A14 ont montré une activité inhibitrice remarquable, des valeurs presque similaires sont obtenus par Bensidhoum et al., (2016), qui quant à eux ont enregistré un pourcentage d'inhibition aux alentours de 60%. Par ailleurs des pourcentages d'inhibition qui oscillent les 95% sont obtenus dans l'étude d'Ajilogba et al., (2013) ; Farhan et al., (2010), une valeur qui est clairement supérieure à la nôtre. Ces différences peuvent être justifiées par des différences dans les sites de prélèvement.

Nos résultats ont montré une inhibition de la croissance mycélienne suite à une confrontation directe avec les isolats bactériens, ce qui indique une interaction antagoniste entre ces bactéries et l'agent pathogène. Dans la littérature des espèces du genre *Bacillus*, comme *Bacillus pumilus* sont fréquemment utilisées dans la lutte biologique à l'égard des phytopathogènes fongiques (Dobrzyński et al., 2023). Ce genre bactérien peut parasiter les microorganismes phytopathogènes en dégradant leurs parois à travers la sécrétion d'enzymes lytiques extracellulaires (Berrada, 2012) et la plupart des espèces ont montré leur capacité à inhiber la croissance d'*Aspergillus*, *Penicillium* et *Fusarium* (Landa et al., 1997). Des études antérieures ont aussi rapporté que les bactéries du genre *Bacillus* produisent des métabolites secondaires antifongiques (diffusibles ou volatiles) comme les lipopeptides et autres différents types de molécules antibiotiques telles que lasurfactine, l'iturine, la bacillomycine, la fengycine, la kanosamine et la zwittermicine (Hang et al., 2005; You et al., 2021; Kamali et al., 2022; Vignesh et al., 2022). *Saccharomyces marcescens* est connue par son fameux pigment rouge non diffusible ; un métabolite secondaire connu sous le nom de « prodigiosine» qui agit comme composé antibactérien et antifongique contre les agents

phytopathogènes (Someya et al., 2001; Alijani et al., 2022). Des espèces du genre *Pseudomonas* peuvent produire des métabolites secondaires diffusibles ou volatils qui ont un effet antifongique important à l'égard d'une large gamme de champignons phytopathogènes (Blanco, 2015; Sherwani et Khan, 2015). Plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer l'inhibition des champignons phytopathogènes par les bactéries y compris la production d'antibiotiques, la sécrétion d'enzymes hydrolytiques, la compétition pour les nutriments ou la combinaison de ces mécanismes (Marschner et Timonen, 2006 ; Jamali et al., 2009). Alabouvette et al., (1993) ont démontré que l'efficacité d'un agent de contrôle biologique n'était pas due à un seul mécanisme mais à une combinaison de différents modes d'action.

3. Caractérisation métabolique et fonctionnelle

3.1. Activités enzymatiques

Différentes enzymes sont recherchées sur boîtes, les activités enzymatiques réalisées sont : les protéases, les uréases, les estérases, les lipases, les amylases et les cellulases. Pour les activités positives, les résultats varient entre faibles, moyens et bons d'un isolat à un autre. L'aspect de quelques boîtes obtenues après incubation est illustré sur la figure N°:20.

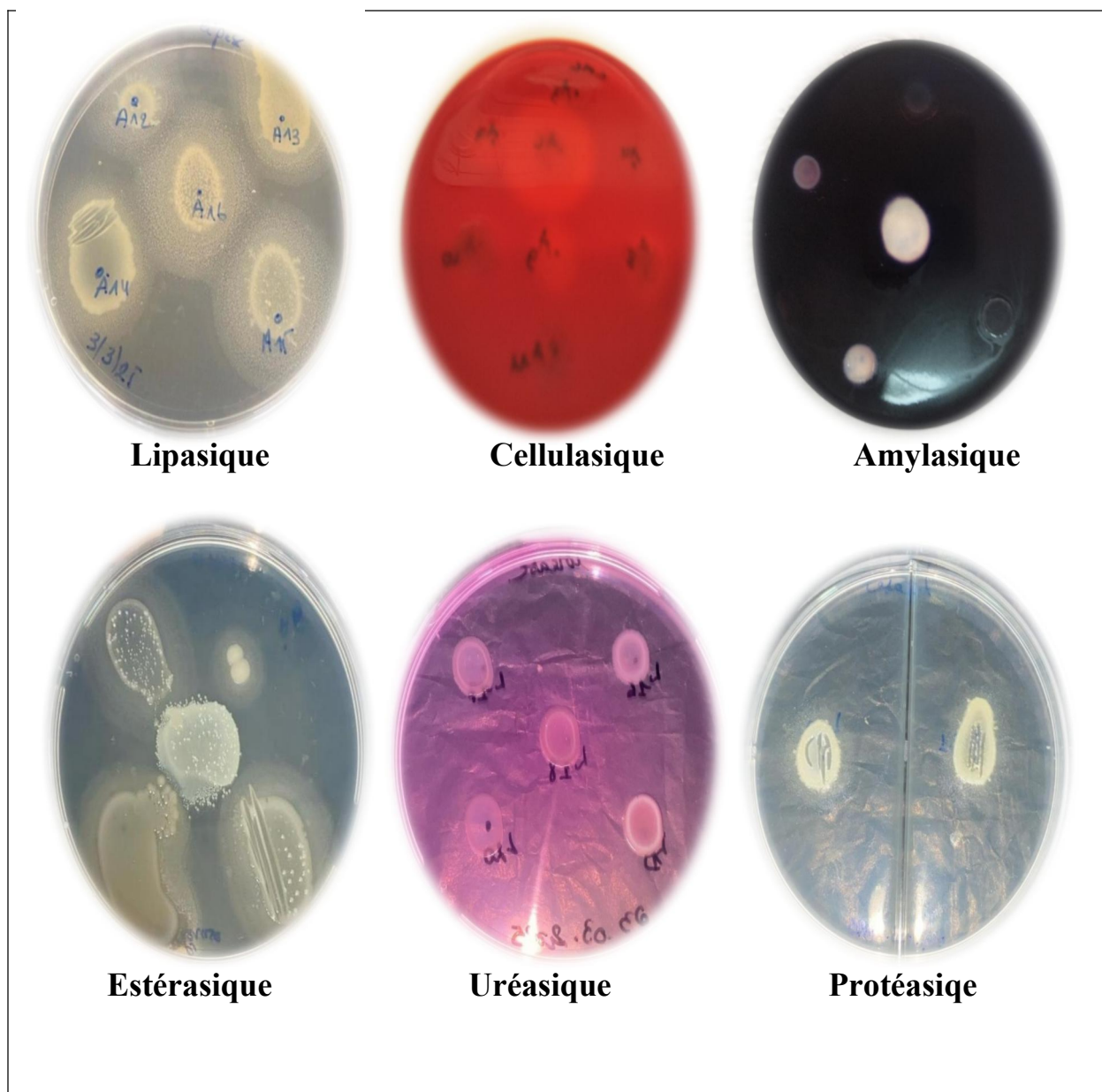


Figure N°20: Aspect de quelques résultats d'activités enzymatiques obtenus sur boîtes.

Les estimations attribuées obtenus sont présentées dans le tableau N°: 01.

TableauN°01 : Résultats des différents tests d'activités enzymatiques réalisés pour les 29 isolats bactériens.

<i>ISOLATS</i>	<i>Protéase</i>	<i>Lipase</i>	<i>Esterase</i>	<i>Urease</i>	<i>Amylase</i>	<i>Cellulase</i>
A1	++++	+	++	++	-	-
A2	++++	++	++	++++	-	-
A3	-	+++	++	-	-	-
A4	+++	+++	++	+++	-	-
A6	+++	-	-	-	+	+++
A7	-	++	++	-	-	+
A8	-	+++	++	-	-	++
A9	+	++	++	-	-	+
A10	-	+++	+++	-	+	-
A11	+	++	-	-	-	-
A12	++	+++	++	-	-	-
A13	+++	+++	+++	++++	+	+++
A14	++++	++++	+++	++++	-	-
A15	-	---	+++	++++	-	-
A16	-	---	+++	-	-	-
F1	-	++	++	++++	-	-
F2	-	++	++	-	-	-
F3	+	++	+	-	-	-
F4	+	++	+	-	-	-
F6	++++	++	-	+++	+	++
F7	+	+++	+++	-	-	-
F8	+	+++	-	-	+	-
F9	-	+++	+++	+++	-	-
F10	++++	+++	++	-	+	++
F11	+++	++	++	-	-	-
F12	+++	++	++	++	-	+++
F13	+++	++	+	-	-	-
F14	-	++	-	-	+	-
F15	-	++	+	++	-	-

-: 0mm ; +: Diamètre entre 1 et 3 mm; ++: Diamètre entre 3 et 6 mm ;
+++ : Diamètre entre 6 et 9 mm ; ++++ : Plus que 12.

D'après ces résultats, les 29 isolats bactériens présentent une variabilité dans leurs capacités à produire leurs enzymes. 18/29 isolats produisent des protéases, 11/29 isolats produisent des ureases, 24/29 produisent des estérases, 26/29 produisent des lipases, 7/29 produisent des amylases et 8/29 sont productrice de cellulases positives. Dans le domaine de la protection biologique, ce sont principalement les enzymes qui dégradent ou lysent la paroi

cellulaire des phytopathogènes. Ce phénomène est répandu où les microbes détruisent les phytopathogènes par sécrétion d'enzymes lytiques et contribuent indirectement à la croissance et au développement des plantes. Plusieurs études sur les hydrolases microbiennes et autres enzymes lytiques ont confirmé leur activité de biocontrôle contre plusieurs agents pathogènes des plantes. L'étude de certaines enzymes fongiques et bactériennes a révélé qu'elles peuvent inhiber ou modifier la synthèse de la paroi cellulaire, perforer la membrane cellulaire ou dégrader la paroi de cette dernière chez l'hôte ou les pathogènes végétaux (Roberti et al., 2002 ; Mota et al., 2017) et sont collectivement connues sous le nom d'enzymes de lutte biologique. Les enzymes sont les catalyseurs du monde biologique. Ce sont des macromolécules présentes dans les cellules de tous les organismes vivants où elles jouent un rôle essentiel dans le métabolisme cellulaire (Drouin, 2005). Les plus courantes sont, les cellulases, les protéases, les β (1, 3)-glucanases et les chitinases. L'un des principaux mécanismes de ces enzymes est l'antibiose ; elle repose sur la reconnaissance de la liaison et la perturbation enzymatique de la paroi cellulaire du pathogène et la production éventuelle de métabolites toxiques inhibant le développement des agents cibles (Bardin, 2015).

3.1.1. Activité protéasique

Dans ce travail, 62,06% des isolats bactériens sont révélés producteurs d'enzymes protéasiques. Ces résultats corroborent avec ceux obtenus par Avinash et Rai., (2014) ayant trouvé un pourcentage d'activité protéasique dépassant les 50%. Dans des travaux établis par Tabli et al., (2018); Ahmad et al., (2013) et Dinesh et al., (2015) et Bensidhoum et al., (2016) 75%, 75%, 100% et 100% d'isolats sont respectivement producteurs de protéases, des résultats largement supérieurs à ceux obtenus dans ce présent travail, à la différence des résultats obtenus par Gontia-Mishra et al., (2016), où 25% d'isolats produisent des protéases, ce qui semble inférieur à nos présents résultats. L'explication de cette variabilité peut être due à la différence du site de prélèvement ainsi qu'à la variabilité et la diversité génétique des isolats bactériens.

3.1.2. Activité uréasique

L'uréase est synthétisée chez de nombreux microorganismes: les bactéries, les algues, les champignons, chez les plantes et chez les invertébrés (Krajewska, 2009). Elle catalyse l'hydrolyse de l'urée dans le sol pour produire le dioxyde de carbone (CO₂) et l'ammoniac (NH₃), ce dernier est une molécule volatile impliquée dans la lutte biologique (Sirko et Brodzik, 2000 ; Martinez-Salgado et al., 2010). 37,93% des isolats produisent l'uréase en quantités variables. Nos résultats sont différents et inférieurs à ceux trouvés par Nabti et al., (2014) où 75% de leurs isolats étaient uréases positifs. Dans leurs travaux, Hasan et al., (2014) et Bensidhoum et al., (2016) ont signalé que 50% de leurs isolats sont producteurs d'uréases. D'autre part, Tabli et al., (2013) ont enregistré que 100% d'isolats bactériens producteurs d'uréase, ce qui est clairement très supérieurs à nos résultats obtenus. Ces différences peuvent être dues aux différents potentiels enzymatiques des isolats et à une différence dans les lieux de prélèvement.

3.1.3. Activité lipasique et estérasique

Les lipases sont produites par des bactéries du genre: *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Pseudomonas* et *Chromobacterium* (Gupta et al., 2004). Les estérases sont des enzymes ubiquitaires qui ont été retrouvées autant chez les Eucaryotes et les Eubactéries, que chez des Archaeobactéries. La production de cette enzyme est vérifiée chez *Aspergillus* sp, *Bacillus* spp, *Pseudomonas* spp et *Arthrobacter* spp (Ramnath et al., 2016). En analysant les résultats obtenus, on constate que les activités lipasiques et estérasiques sont présentes dans 89,65% et 82,75% des isolats respectivement. Dans l'étude réalisée par Tabli et al., (2013), 100% des isolats ont montré une activité estérasique positive, ce qui coïncide avec nos résultats obtenus et Concernant l'activité lipasique, 50% des isolats obtenus sont lipases positives, ce qui semble inférieur à nos résultats. De leur part, Bensidhoum et al., (2016), ont enregistré des résultats de 51% et 69,38% pour l'activité estérasique et lipasique respectivement ce qui est inférieur à nos résultats obtenus.

Par ailleurs, dans les études réalisées par Carrim et al., (2006), 40% des isolats ont présenté des activités lipasiques et estérasiques, résultats semblant très inférieurs par rapport aux résultats obtenus dans ce présent travail. Ça peut être expliqué par une variabilité et une diversité génétique des isolats bactériens et à la différence de la période et du site de prélèvement. Selon Senthilkumar R et Selvkumar G (2008), la production de lipase par le micro-organisme dépend largement de l'espèce, des souches et des conditions de culture qui sont responsables de l'hydrolyse des lipides. La synthèse des lipases et des estérases par les bactéries testées pourrait participer au recyclage de la matière organique en fournissant les

éléments nécessaires aux plantes (AjarNathYadav et al., 2020). Il est bien connu que ces peptides antifongiques inhibent la croissance d'un grand nombre de champignons y compris les genres *Aspergillus*, *Penicillium* et *Fusarium*, ainsi que les oomycètes et les bactéries (Munimbazi et Bullerman, 1998).

3.1.4. Activité amylasique

L'amylase est une enzyme capable d'hydrolyser l'amidon en sucres simples. Ces enzymes peuvent être produites par plusieurs sources : microbiennes, animales et même végétales, mais la plus demandée en industrie est l'amylase microbienne grâce à sa disponibilité et à sa volumineuse production (Vidylakshmi, 2009 ; Mathew et al., 2016).

L'activité amylasique a été enregistrée chez 24,13% des isolats bactériens. Ces résultats coïncident avec ceux obtenus par Dinesh et al., (2015), Lafkir et Mahbous, (2018) qui ont constaté que 25% et 27% des souches sont productrices d'amylases respectivement. Par ailleurs, des résultats largement supérieurs sont enregistrés par Tabli et al., (2013); Nabti et al., (2014) et Bensidhoum et al., (2016) où 100% des souches ont montré une activité positive pour cette enzyme test. Ces différences peuvent être dues à la différence du site de prélèvement ainsi qu'à la variabilité et la diversité génétique des isolats bactériens. La synthèse des enzymes amylasiques par les bactéries du sol permet de dégrader la matière organique dans la nature et fournir ainsi des éléments minéraux que les plantes vont utiliser pour leur croissance. Quand l'amidon est dégradé, les produits finaux solubles tels que le glucose et le maltose sont absorbés par les cellules (Ekunsaumi, 2002).

3.1.5. Activité cellulasique

Les cellulases sont les enzymes responsables de l'hydrolyse de la cellulose et font partie de la famille des glycoside-hydrolases. Elles sont secrétées par des champignons, ou associées à la surface des micro-organismes où elles forment des cellulosomes (Claisse, 2012). La production de cellulases peut également contribuer à une activité de biocontrôle (Souza, 2015). Ces enzymes jouent un rôle majeur dans la dégradation des parois cellulaires fongiques (Reetha et al., 2014). 27,58% des isolats bactériens ont montré une activité cellulasique positive. Nos résultats sont inférieurs à ceux trouvés par Avinash et Rai, (2014); Gontia-Mishra et al., (2016) et Lafkir et Mahbous, (2018), ont constaté quant à eux que 50% des isolats sont producteurs de cellulase. Des résultats largement supérieurs sont enregistrés par Bensidhoum et al., (2016), ont montré 100% des souches ont montré une activité cellulasique positive. Cette différence peut-être due au type du Gram de nos isolats.

Schwarz, (2001) affirme que 80% des bactéries qui produisent la cellulase sont des Gram +. Nos résultats corroborent avec ceux obtenus par Tabli et al.,(2013) ; Ahmad et al., (2013) et Dinesh et al., (2015), où 25% des isolats obtenus étaient cellulases positifs.

3.2. Recherche de métabolites bioactifs à activité antifongique

Une série de tests a été effectuée durant cette investigation, afin de rechercher et de déterminer les mécanismes d'activités probables de nos isolats contre les trois champignons phytopathogènes. Deux métabolites antifongiques de nature volatile (NH_3 et HCN) ont été recherchés afin de vérifier leur implication dans l'activité antagoniste à l'égard des champignons phytopathogènes. Les résultats des tests de la production d'ammoniac (NH_3) et de cyanure d'hydrogène (HCN) sont présentés dans le tableau et les figure suivants.

Tableau N° 02 : Résultats des tests de production d'HCN et NH₃.

Isolats	HCN	NH ₃	Isolats	HCN	NH ₃
A1	+++	+	F1	-	+
A2	+++	+	F2	-	++
A3	-	+	F3	-	++
A4	++	+	F4	-	+++
A6	-	+	F6	-	-
A7	-	++	F7	-	-
A8	-	-	F8	-	-
A9	-	-	F9	-	-
A10	-	+	F10	-	+
A11	-	-	F11	-	+
A12	-	+	F12	-	-
A13	+++	-	F13	-	-
A14	++	++	F14	-	++
A15	-	-	F15	-	-
A16	-	+			

-: 0mm ; +: Diamètre entre 1 et 3 mm; ++: Diamètre entre 3 et 6 mm ;

+++ : Diamètre entre 6 et 9 mm ; ++++ : Plus que 12.

Parmi les genres bactériens connus pour leur production de molécules volatiles, on cite les genres *Pseudomonas* et *Bacillus* qui sont largement connus pour leur activité antagoniste à l'égard des bactéries et des champignons phytopathogènes. Chaves Lopez et al., (2015) ont rapporté que les espèces *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus* et *B. amyloliquefaciens* sont les meilleurs producteurs de substances volatiles antifongiques.

3.2.1. Production de cyanure d'hydrogène (HCN)

La synthèse d'HCN est une activité commune entre les espèces bactériennes appartenant aux genres *Pseudomonas* et *Bacillus* (Kachhap et al., 2015). L'HCN est décrit comme un composé métabolique de biocontrôle qui aide à protéger de nombreuses plantes des maladies causées par les champignons phytopathogènes (Ramette et al., 2003 ; Jousset et al., 2006). D'autres auteurs ont rapporté que cette molécule volatile pourrait également augmenter la disponibilité des nutriments dans le sol en séquestrant des minéraux tels que le phosphate (Rijavec et al., 2016). Le changement de la couleur du papier Whatman imprégné de la solution de picrate de sodium révèle la capacité des isolats à produire un antibiotique de nature volatile qui est l'HCN. 5 isolats sur les 29 (17, 24%) sont révélés producteurs de Cyanure d'hydrogène (HCN), ce qui semble inférieur aux résultats obtenus par Saharan et Nehra, (2011) et Damodaran et al., (2013), estimés à 75 % et 50% respectivement. Par ailleurs, dans

les études réalisées par d'Avinash et Rai., (2014), la totalité des isolats bactériens ont produit de cyanure d'hydrogène, ce qui est largement supérieurs à nos résultats. 25% des isolats sont producteurs d'HCN dans les travaux publiés par Dinesh et al., (2015), ce qui coïncide avec nos résultats. La figure ci-dessous présente les résultats enregistrés pour les isolats A1 et A2 comparativement au témoin négatif.

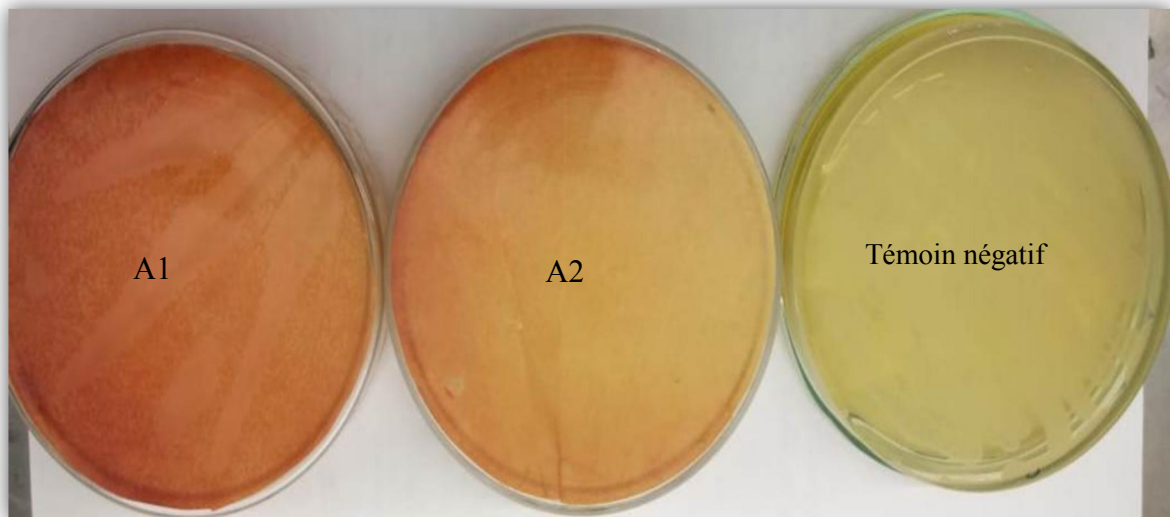


Figure N°21: Résultats du test de production d'acide cyanhydrique(HCN) comparés au témoin négatif.

3.2.2. Production d'ammoniac (NH_3)

L'ammoniac est l'agent inhibiteur de certains phytopathogènes. Il est produit comme un intermédiaire du catabolisme des acides aminés des exsudats racinaires assimilés par les bactéries du sol (Cherif, 2014). La production d'ammoniac par les bactéries est l'un des mécanismes impliqués dans la lutte biologique contre les agents phytopathogènes (Ahmed et al., 2008). Après 4 jours d'incubation et l'ajout du réactif de Nessler, la couleur de l'eau peptonée inoculée a viré au jaune foncé indiquant la présence de l'ammoniac dans le tube eppendorf (il y'a eu révélation d'une différence par rapport au témoin non inoculé). 17 isolats sur les 29 (58.62%) à ont confirmé la production d'ammoniac (NH_3). Nos résultats diffèrent de ceux observés par Ahmad et al., (2008) ; Gontia-Mishra et al., (2016) et Tabli et al.(2018), qui ont démontré que la totalité de leurs isolats testés sont producteurs d'ammoniac, de même pour le travail publié par Dinesh et al., (2015), 88% des isolats bactériens ont produit l'ammoniac, des résultats supérieurs à ceux enregistrés pour nos isolats. La figure ci-dessous présente l'aspect des résultats enregistrés en présence de témoin.

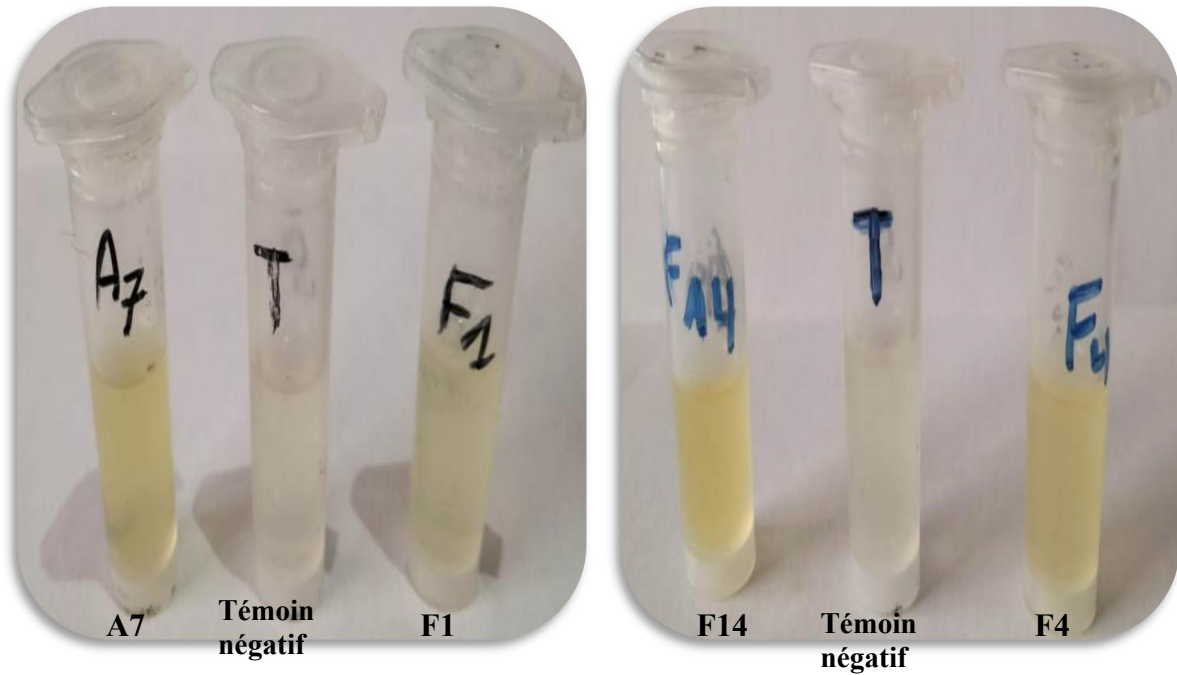


Figure N° 22 : Résultats du test de production d'ammoniac (NH_3) en présence d'un témoin négatif.

4. D'autres molécules antifongiques volatiles

L'objectif de cette expérience était d'évaluer l'effet inhibiteur des molécules volatiles produites par les différents isolats bactériens d'origine aquatiques sur la croissance du champignon phytopathogène *Aspergillus niger*. Le test a été réalisé en superposant deux boîtes, où une coulée du milieu PDA contenant un disque fongique et l'autre un milieu PCA ensemencé d'isolats bactériens par stries, les deux sellées avec du parafilm. Permettant l'exposition du champignon aux molécules volatiles sans contact direct avec la bactérie.

Après incubation, dans les boîtes témoins, *A. niger* a montré une croissance mycélienne homogène, dense avec apparition des spores, ce qui traduit une absence d'inhibition en conditions normales. En revanche, dans les boîtes testes où le champignon est exposé aux composés volatiles de certains isolats bactériens, une réduction du diamètre de la croissance mycélienne et un changement de l'aspect mycélien ont été constaté. C'est le cas, de l'isolat F4, pour lequel une inhibition de la croissance fongique a été observée avec un PGI de $55\% \pm 0.035$. Le pourcentage d'inhibition de croissance a été calculé pour les dix isolats testés. Les résultats obtenus sont illustrés dans la figure ci-dessous :

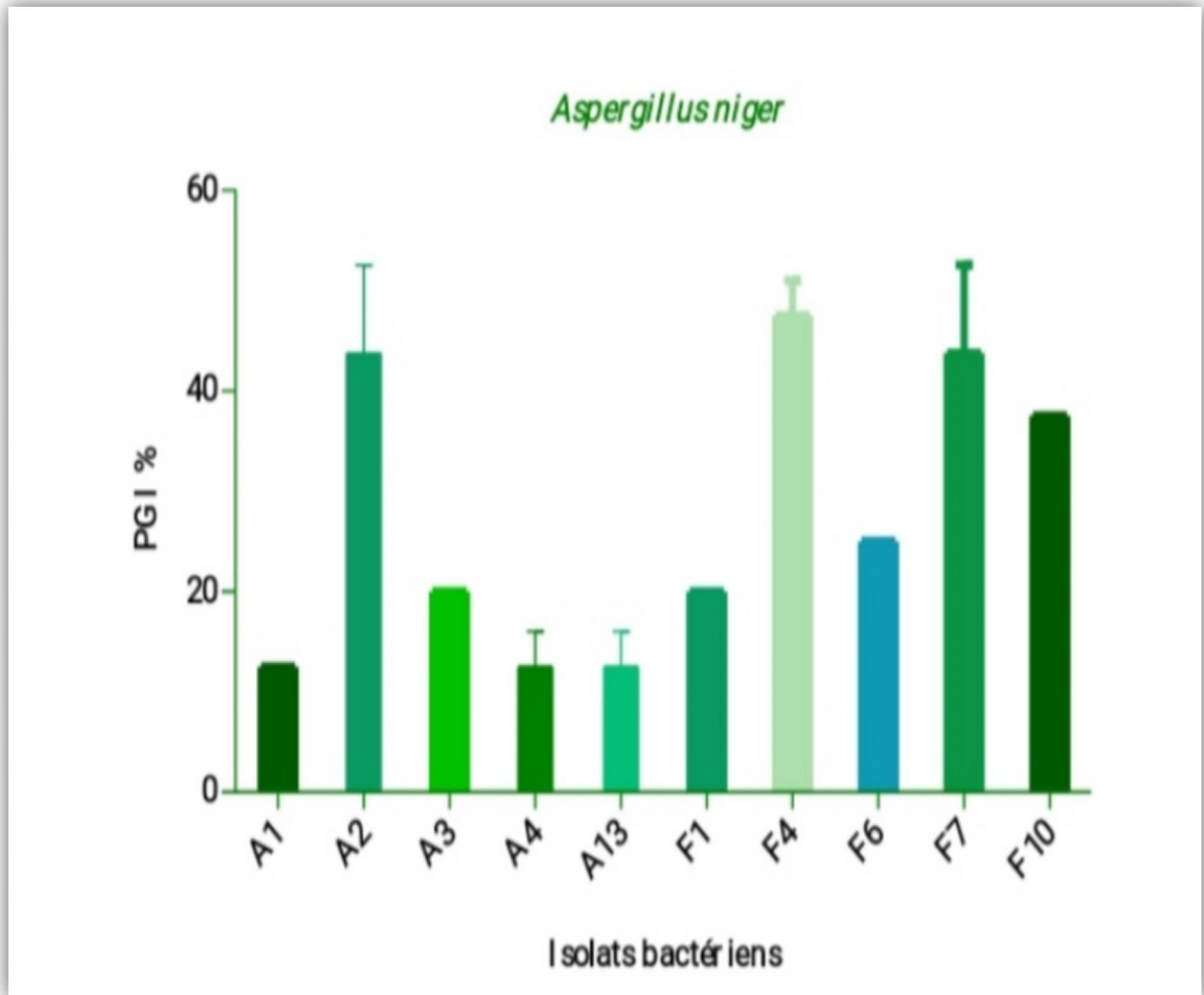


Figure N° 23: PGI% d'*Aspergillus niger* obtenus suite à la production de substances volatiles par les 10 isolats.

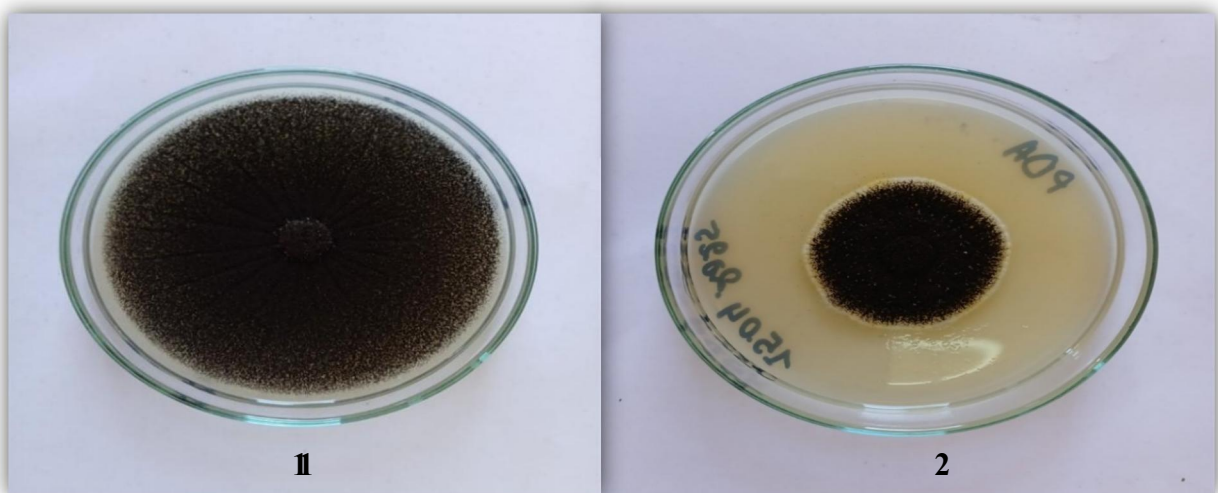


Figure N° 24: Effet des substances volatiles sur la croissance et l'aspect mycélien d'*Aspergillus niger*. 1 : témoin ; 2 : isolat F4.

L'isolat F4 a le taux d'inhibition le plus élevé, ce qui se traduit par une forte capacité à produire des molécules volatiles efficaces à l'égard d'*Aspergillus niger*. Des niveaux d'inhibition comparables ont été observés pour les isolats A2 et F7, avec des pourcentages d'inhibition de 45%, soulignant leur potentiel en tant qu'agents de biocontrôle. Alors que F1 et A3 ont montré des effets inhibiteurs faibles à modérés avec une valeur de PGI de 20% ± 0.00 . Quant aux isolats F10 et F6 des inhibitions modérées avec des valeurs de 25% ± 0.00 et 35% ± 0.00 sont enregistrées. Bien que ces taux soient inférieurs à ceux obtenus avec l'isolat F4, ils suggèrent néanmoins la présence d'une activité inhibitrice qui pourrait être exploitée, en particulier si elle est liée à d'autres mécanismes de biocontrôle. Pour les isolats A1, A4 et A13 des PGI plus faibles, allant de 12 % à 15 %, indiquant une production limitée de molécules volatils.

Les composés volatils du métabolisme microbien peuvent souvent empêcher la croissance fongique, prévenir les maladies, promouvoir la croissance, ou induire une résistance. Ceux-ci constituent une classe importante de ressources de biocontrôle. Les substances antimicrobiennes volatiles ont plusieurs propriétés qui leur sont spécifiques, y compris la pénétration rapide dans la cible et leur effet à faible dose. Ceci tend à rendre leurs effets préventifs des maladies plus prononcés, et ainsi élargir leur champ d'application (You et al, 2015). Malgré l'absence d'un contact direct entre les champignons et les isolats bactériens, ces derniers ont pu exercer une activité inhibitrice sur le développement mycélien. Plusieurs études ont montré que de nombreux microorganismes peuvent produire des substances antimicrobiennes volatiles (Wenke et al., 2012). Nos résultats montrent que 80% des isolats bactériens d'origine aquatique sont producteurs de ces métabolites avec des taux d'inhibition de croissance variables à l'égard d'*A. niger*.

Les isolats F4, F7 et A2 sont inférieurs à ceux obtenus par Tabli et al., (2023), où un pourcentage d'inhibition allant jusqu'à 85,37% a été trouvé et ceux de Ghaemi et al., (2023), qui ont démontré une inhibition de 73 % à l'égard d'*Aspergillus niger* par les molécules volatiles produites par un isolat bactérien. Cette différence peut être interprétée par une variabilité génétique des isolats bactériens testés, ou suite à une différence dans le site de prélèvement.

De plus, nos résultats rejoignent ceux de Bensidhoum et al., (2015), ont observé une inhibition de 65,81% sur *Botrytis cinerea* via des composés volatils produits par un isolat

bactérien d'origine aquatique. Bien que le champignon ciblé soit différent, la méthode expérimentale identique permet une comparaison pertinente.

Les isolats F6, F10, F1 et A3 ont exprimé une activité modérée avec un PGI allant de 20% à 35 %, tandis qu'A1, A4 et A13 ont exprimé une inhibition inférieure à 15%, ce qui voulait dire une faible activité antifongique.

Ce type de variabilité est bien documenté dans les travaux de Tabli et al., (2018 ; 2020), où des isolats bactériens d'origine aquatiques montraient des inhibitions modérées. Selon Wenke et al., (2012) et You et al., (2015), cette variabilité peut s'expliquer par une production de molécules volatiles conditionnelles, induites par la présence du phytopathogène.

Nos résultats confirment que la production des molécules volatiles constitue un mécanisme de biocontrôle efficace contre *Aspergillus niger*, mais dépendant à la fois de l'isolat bactérien et des conditions de production des métabolites. Une meilleure compréhension des facteurs régulant cette production, ainsi qu'une caractérisation fine de la nature chimique des molécules volatiles impliquées, permettrait de renforcer l'efficacité de ce mode d'action dans les stratégies de lutte biologique.

5. Inhibition de la pourriture noire d'*Aspergillus niger* sur la tomate

Les résultats du test *in vivo* ont montré l'efficacité inhibitrice des isolats bactériens A1 et A2 à l'égard d'*Aspergillus niger*. Les fruits infectés par le champignon seul (Asp) ont produit une surface pourrie d'une moyenne de $11,01 \pm 0,82 \text{ cm}^2$, reflétant une forte activité phytopathogène. En revanche, la co-inoculation de la souche A1 avec *Aspergillus niger* a entraîné une réduction significative de cette surface à $6,89 \pm 0,96 \text{ cm}^2$ ($p < 0,005$), indiquant un effet inhibiteur marqué de l'isolat bactérien. De manière similaire, l'association de la souche A2 avec *Aspergillus niger* a conduit à une diminution de la surface de pourriture de $7,58 \pm 0,96 \text{ cm}^2$, également significative ($p < 0,005$). Ces résultats confirment que ces deux isolats bactériens possèdent un potentiel antifongique notable, avec une efficacité légèrement supérieure pour l'isolat A1. Cette activité pourrait être attribuée à la production de métabolites antifongiques ou à une compétition directe avec le champignon phytopathogène. Les résultats obtenus dans cette expérience sont illustrés dans les figures ci-dessous :

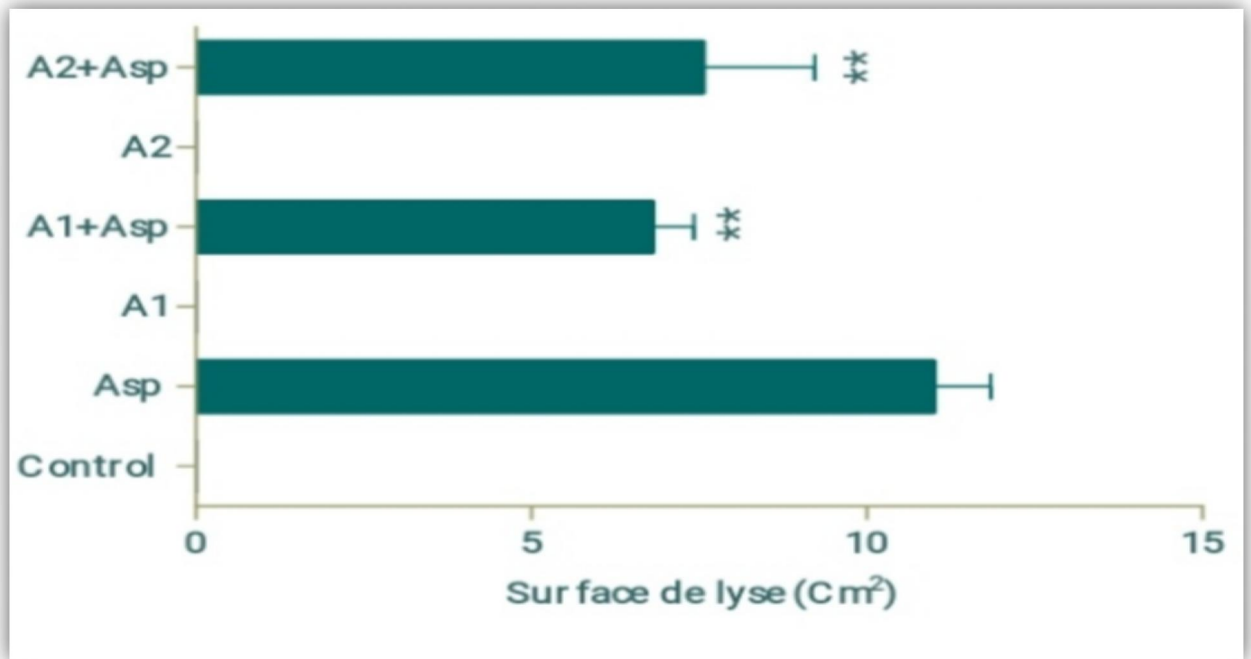


Figure N°25: Résultats de surface de lyse causée par *Aspergillus niger* lesur fruits de tomate obtenus avec les isolats A1 et A2.

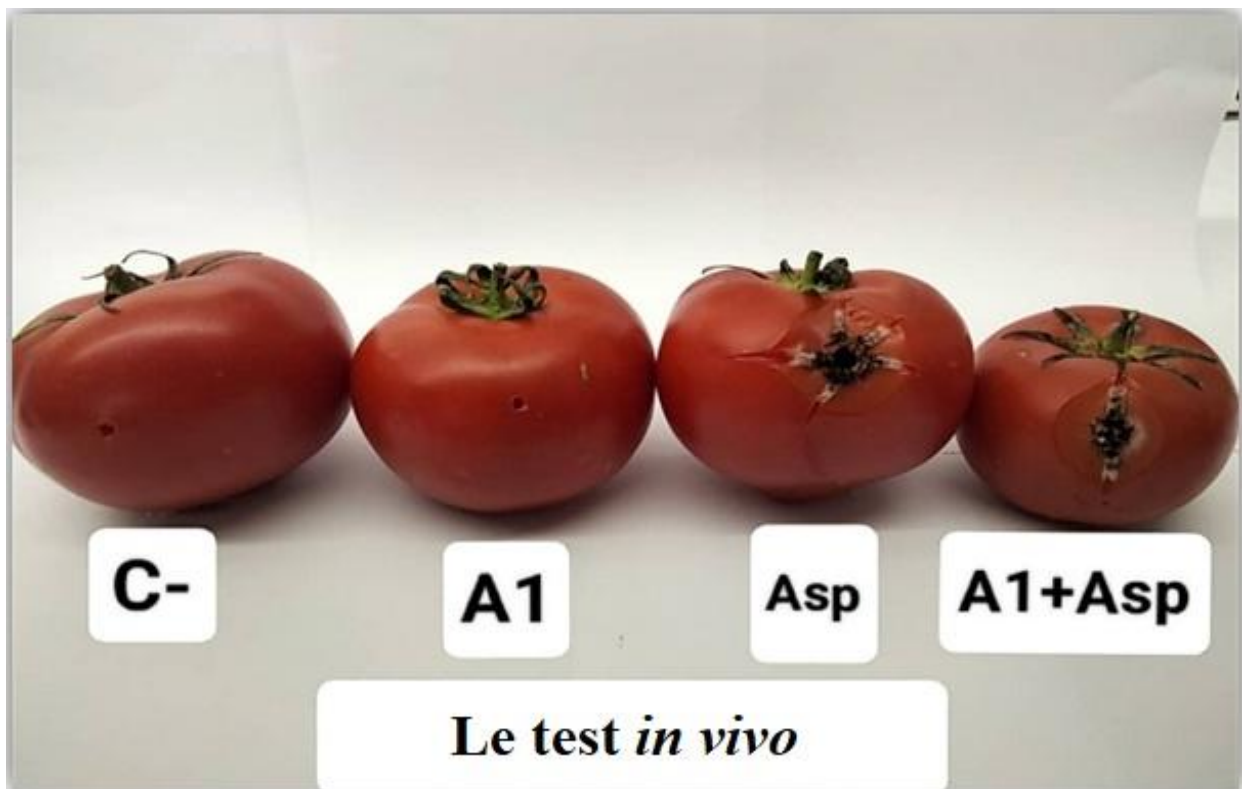


Figure N° 26: Inhibition de la pourriture d'*Aspergillus niger* par l'isolat A1 sur fruits de tomate. C- : contrôle négatif.

De nombreux travaux *in vivo* ont été menés pour évaluer l'efficacité d'isolats bactériens contre des champignons phytopathogènes, même lorsque la cible est différente d'*Aspergillus niger*. Les résultats obtenus *in vivo* viennent de confirmer ce qui est trouvé par Ahmed et al., 2008, où ils ont rapporté que les bons résultats *in vitro* ne peuvent pas toujours être reproduits de façon fiable dans les conditions *in vivo* et le contraire est juste. Des résultats comparables ont été rapportés par d'autres auteurs. Par exemple nos résultats sont corroborés avec ceux de Tabli et al., (2023), qui ont montré que certains isolats bactériens isolés d'eaux du même puits sont capables de réduire significativement les symptômes de la pourriture noire due *A. niger*.

De plus, Agrillo et al., (2019) ont démontré qu'une protéine bioactive fabriquée à partir de *Pseudomonas protegens* obtenu du même puits était capable de réduire la croissance d'*Aspergillus niger* sur fruits de tomate de près de 80 %. Le mode d'action de nos isolats peut également impliquer la séquestration de protéines ou d'autres métabolites antifongiques, même si nos pourcentages de réduction sont plus faibles.

L'étude de Rai et al., (2016) réalisée sur la pomme a également mis en évidence une réduction importante des symptômes d'*Aspergillus niger* après traitement par une souche de *Pseudomonas protegens-RhiNA*. De leur côté, Bensidhoum et al., (2015) ont rapporté qu'un isolat bactérien réduisait de 57% la croissance de *Botrytis cinerea* sur feuilles de laitue. Ces résultats reflètent l'idée que les effets observés ne sont pas spécifiques à une seule espèce et que l'efficacité antagoniste varie d'un fruit à un autre. Ces différences de résultats obtenus pour ce test peuvent être expliquées par une variabilité génétique des isolats testés.

Les travaux, *in vivo*, de Tabli et al., (2018), montrent que des souches appartenant au genre *Pseudomonas* sont capables de stimuler la croissance des plantules de tomate et de petit-pois infectés grâce à leurs capacités à synthétiser plusieurs métabolites d'intérêt agricole tels que les antibiotiques, les phytohormones, les enzymes lytiques et les sidérophores. Ce qui est confirmé par (Kavitha et al., 2013 ; Vranova et al., 2013 ; Jadhav et al., 2017 et Halimursyadah et al., (2023), ou ils rapportent que l'activité antifongique peut être attribuée à la capacité des isolats à produire diverses enzymes lytiques telles que la chitinase, la protéase et la cellulase, ainsi que des composés antifongiques volatils comme l'HCN et le NH₃, tous connus pour leurs propriétés antifongiques. Limal et al.,(1999) ajoutent que des levures telles que *Rhodotorula glutin* sont capables d'inhiber et d'éliminer les maladies causées par des

champignons phytopathogènes comme *Aspergillus niger* à des niveaux hautement significatifs.

Ces observations s'inscrivent pleinement dans le cadre de biocontrôle, qui privilégie l'usage de micro-organismes bénéfiques pour limiter la propagation des agents phytopathogènes. Les performances des isolats A1 et A2 laissent entrevoir leur potentiel en tant qu'agents de biocontrôle.

Dans le domaine de la protection des cultures, beaucoup d'efforts ont été réalisés ces dernières années pour la recherche de nouvelles stratégies de lutte contre les champignons phytopathogènes. Le contrôle biologique des phytopathogènes par l'utilisation des bactéries antagonistes a été suggéré comme une alternative à l'utilisation de substances chimiques. Ce travail a pour objectif de sélectionner des agents bactériens de lutte biologique efficaces et capables de protéger les plantes des attaques causées principalement par les champignons en étudiant leurs effets antagonistes *in vitro* et *in vivo*.

Nous avons entamé ce travail par l'isolement des bactéries à partir de 2 échantillons d'eau de puits à usage agricole. Ceci nous a permis d'obtenir 29 isolats qui ont été testés pour vérifier leur éventuel potentiel inhibiteur *vis-à-vis* de trois champignons phytopathogènes : *Aspergillus niger*, *Penicillium* sp et *Fusarium* sp selon la méthode de confrontation directe sur boîte. Les résultats obtenus ont montré que l'ensemble des isolats inhibent au moins un champignon phytopathogène, avec des valeurs de PGI allant de 32% à 78,5% à l'égard d'*Aspergillus niger*, 15% à 77,5% à l'égard de *Penicillium* sp et 6% à 65% à l'égard *Fusarium* sp. Cette capacité à lutter contre les champignons phytopathogènes est due à la production d'enzymes lytiques telles que les protéases, lipases, estérases, amylases, et uréase qui ont aussi un intérêt agricole remarquable grâce leur implication dans la fertilisation des sols à travers la dégradation des polymères organiques, ainsi que la production de métabolites bioactifs à activité antifongique à savoir : l'HCN et l'ammoniac.

Les dix meilleurs isolats sélectionnés du test d'antagonisme sur boîte ont été testés pour leur production de substances antifongiques volatiles à l'égard d'*Aspergillus niger* et en fin, les deux isolats (A1 et A2) ont été appliqués séparément sur des fruits de tomate pour vérifier leur capacité de réduire la pourriture noire causée par ce même champignon. Notre travail reste préliminaire et mérite d'être complété par :

- Tester l'activité de nos isolats sur d'autres champignons (genres et espèces) ;
- Identification phylogénétique des isolats bactériens ;
- Rechercher d'autres activités à savoir la résistance aux métaux lourds et l'activité insecticide des isolats bactériens ;
- Réalisation des tests d'inoculation *in vivo* (sur plantes), au laboratoire ou sur champs pour vérifier leurs caractères de promotion de la croissance des plantes;
- Extraction, purification, et essais de caractérisation des molécules à rôle antifongique.

A

- Abdul Razzaq, A., Shamsi, S., Ali, A., Ali, Q., Sajjad, M., Malik, A., & Ashraf, M. (2019). Microbial proteases applications. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 7, 110. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00110>.
- Adli. M. (2017). La lutte intégrée, une méthode à considérer, *journal gestion et technologie agricole (GTA)*.
- Agrillo, B., Mirino, S., Tatè, R., Gratino, L., Gogliettino, M., Cocca, E., Tabli, N., Nabti, E., & Palmieri, G. (2019). An alternative biocontrol agent of soil-borne phytopathogens: A new antifungal compound produced by a plant growth promoting bacterium isolated from North Algeria. *Microbiological Research*, 221, 60–69.
- Agrios, G., N. (2005). *Plant Pathology*. 5th Edition. Elsevier Academic Press, USA UK.
- Ahammed, G. J., & Yang, Y. (2021). Mechanisms of silicon-induced fungal disease resistance in plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 165, 200-206.
- Ahmed F, Ahmad I, et Khan M.S. (2008). Screening of free-living rhizospheric bacterie for their multiple plant growth promoting activities. *Microbiological Research*. 163, 173-181
- Ahmed, M. et Kibret, M. (2013) Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria : current perspective. *J King Saud Univer-Scien* 26(01) : 1-20.
- Ajar Nath Yadav et Ali Asghar Rastegari, Neelam Yadav et Divjot Kour. (2020). Advances in Plant Microbiome and Sustainable Agriculture Diversity and Biotechnological Applications. *Biofertilizers and Biopesticides: Microbes for Sustainable Agriculture*. (19): 260-262.
- Ajilogba C E; Babalola O O and Ahmed F. (2013). Antagonistic effects of *Bacillus* species in biocontrol of tomato *Fusarium* wilt. *Ethno Med*, 7(3): 205-216
- Alabouvette. C. Lemanceau, P, Steinberg, C. (1993). Recent advances in the biological control of *Fusarium* wilts. *Pest.Sci.*, 37, pp.365-373.
- Aleksic B, Bailly S, Draghi M., (2016). Production of four macrocyclic trichothecenes By *Stachybotrys chartarum* during its development on different building materials as measured by UPLC-MS/MS. *Build Environ* 106:265-273.
- Alijani, Z., Amini, J., Ashengroph, M., & Bahramnejad, B. (2022). Antifungal Activity of *Serratia rubidaea* Mar61-01 Purified Prodigiosin against *Colletotrichum nymphaeae*, the Causal Agent of Strawberry Anthracnose. *Journal of Plant Growth Regulation*, 1-11.
- Aouar Lamia, Sylvain Lerat, Ammar Ouffroukh, Abderrahmane Boulahrouf & Carole Beaulieu (2012). Taxonomic identification of rhizospheric actinobacteria isolated

From Algerian semiarid Canadian Journal of plant Pathology ». 165-176 soil exhibiting antagonistic activities against plant fungal pathogens.

●Avinash, T.S., Rai, R.V. (2014). Antifungal Activity of Plant Growth Promoting Rhizobacteria against *Fusarium oxysporum* and Phoma sp. of Cucurbitaceae. In: Kharwar, R., Upadhyay, R., Dubey, N., Raghuwanshi, (eds) Microbial Diversity and Biotechnology in Food Security. Springer, New Delhi, 257–264.

B

●Bach, H.J., Munch, J.C. (2000). Identification of bacterial sources of soil peptidases. Biol Fertil Soils, 31, 219-224.

●Bardin M. (2015). Facteurs d'efficacité de la protection biologique contre les maladies des plantes. In : 11e Conférence Internationale sur les Maladies des Plantes, Tours, 7-9 décembre 2015.

●Bardin, M., Ajouz, S., Comby, M., Lopez-Ferber, M., Graillot, B., Siegwart, M., & Nicot, P. C. (2015). Is the efficacy of biological control against plant diseases likely to be more durable than that of chemical pesticides? Frontiers in Plant Science, 6, 566.

●Bautista-Baños, S. (Ed.). (2014). Postharvest decay: Control strategies. Elsevier.

●Belhadi, A., Mehenni, M., Reguieg, L., Yakhlef, H. (2016). Pratiques Phytosanitaires des serres maraîchères de trois localités de l'est des Ziban et leur impact potentiel sur la santé humaine et l'environnement. Revue Agriculture. 1, 9 – 16.

●Benabdi, H. (2017). Etude de quelques aspects physiologiques d'une souche de *Fusarium oxysporum* f.sp. lycopersici race 1, agent causal du *Fusarium* wilt sur tomate. Relation avec l'extension de la maladie. Mémoire de Master, Univ. Mohammed Khider-Biskra.

●Benmehidi, O., Boukaabache, Y., (2018). Pépinière des principales maladies fongiques du blé dur dans la région de Constantine. Mémoire de Master : Biologie et Physiologie Végétale. Constantine: Université des Frères Mentouri Constantine, 87p.

●Bensidhoum, L., Rai, A., Tabli, N., Kahouadji, N., Khaber, M., & Nabti, E. (2015). Biological control of *Botrytis cinerea* by *Bacillus* sp. strain S7LiBe under abiotic stress. International Journal of Scientific Research in Science and Technology (IJSRST), 1(6), CIBA 2015 Special Issue, 7.

●Bettou, M., Righi, M., (2018). Contribution à la lutte chimique et biologique contre l'agent causal de la tache septorienne du blé « *Zymoseptoria tritici* » *in vitro*. Mémoire Master : Microbiologie. Constantine : Université des Frères Mentouri Constantine 1, 66p.

- Blaalid, R., &Khomich, M. (2021). Current knowledge of Chytridiomycota diversity in Northern Europe and future research needs. *Fungal Biology Reviews*, 36, 42-51.
- Blake, C. M., et al. (2021). *Bacillus* spp. as biocontrol agents: Mechanisms and applications. *Microorganisms*, 9(11), 2345.
- Booth, J., Schenk, P. M., &Mirzaee, H. (2022).Microbial Biopesticide against Bacterial, Fungal and Oomycete Pathogens of Tomato, Cabbage and Chickpea.*Applied Microbiology*, 2(1), 288-301.

C

- Cappucino, J.C., Sherman, N. (1992).Negative staining. *Microbiology: A laboratory Manual*, 3, 125-179.
- Carrim, A. J. I., Barbosa, E.C., Gonçalves Vieira J.D. (2006). Enzymatic Activity of Endophytic Bacterial Isolates of *Jacaranda decurrens* Cham.(Carobinhado- campo). *Braz. Arch. Biolog. Technol*, 49(3), 353-359.
- Carvalho, F. P. (2017).Pesticides, environment, and food safety. *Food and Energy Security*, 6(2), 48–60.
- Chandler, D., Bailey, A. S., Tatchell, G. M., Davidson, G., Greaves, J., & Grant, W. P. (2011).The development, regulation and use of biopesticides for integrated pest management. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 366(1573), 1987–1998.
- Charmaine A., et al. (2023).Bioactive and Unusual Steroids from *Penicillium Fungi*.*Phytochemistry*, 203, 113383.
- Chaves- Lopez C., Serio A., Gianotti A., Sacchetti G., Ndagijimana M., Ciccarone C., Stellarini A., Corsetti A et Paparella A. (2015). Diversity of food-borne *Bacillus* Volatile compounds and influence on fungal growth.*J ornal of Applied Microbiology*.199: 487- 499.
- Chen, X. H., Koumoutsi, A., Scholz, R., Eisenreich, A., Schneider, K., Heinemeyer, I., ...&Borriss, R. (2009). Comparative analysis of the complete genome sequence of the plant growth-promoting bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42.*Nature Biotechnology*, 25(9), 1007–1014.
- Cherif, H. (2014). Amelioration de la croissance du blé dur en milieu salin par inoculation avec *Bacillus* sp.et *pantoea* agglomerans isolées de sols. Thèse de doctorat en microbiologie, université ferhat abbas sétif. 162
- Choudhary, D., et Varma, A. (2016).Microbial-mediated induced systemic resistance in plants.New York : Springer.226p.
- Choudhary, D.K., Johri, B.N. (2009). Interactions of *Bacillus* sp. and plantsWith special reference to induced systemic resistance (ISR). *Microbiology Research*, 164(5-6), 493- 513.

- Christensen, W.B. (1946). Urea Decomposition as a Means of Differentiating *Proteus* and *Paracolon* Cultures from Each Other and from *Salmonella* and *Shigella* Types. *Journal of Bacteriology*, 52, 461-466.
- Comporata. (1985). « Antagonisme in vitro de *Trichoderma* spp vis à vis de *Rhizoctinia solani*, pp. 613-620. INRA Paris (FR).
- Corbaz R. (1990) .Principes de phytopathologie et de lutte contre les maladies des plantes. Presses polytechniques et universitaire romandes (1ère édition). Lausanne. Suisse. 286p.
- Crow, W. T., et al. (2019). Foliar Nematode *Aphelenchoides* spp. (Nematoda:*Aphelenchida*). University of Florida Institute of Food and Agricultural Sciences Extension.

D

- Dabé, D., Noël, Z. G., & Adolphe, Z. (2017) Propriétés Antifongiques des Légumineuses Médicinales de Côte d'Ivoire: cas de *Crotalaria retusa* L (*Fabaceae*) sur La croissance *in vitro* de *Phytophthora* sp et *Fusarium solani*, Deux Champignons Phytopathogènes.
- Damodaran T, Sah V, Rai R.B, Sharma D.K, Mishra V.K, Jha S.K et Kannan R(2013). Isolation of salttolerant endophytic and rhizospheric bacteria by natural selection and screening for promising plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) and growth vigour in tomat oundersodic environment.African Journal of Microbiology Research. Vol.7(44), pp.5082-5089.
- Derdj, D., (2017). Effet des actinomycètes sur l'agent phytopathogène (*Fusarium* ssp.) chez le blé dur (*Triticum durum* Desf.). Mémoire Master : Biotechnologies végétales et métagénomique. Msila : Université Mohamed Boudiaf, 86p.
- Deshwal, V.K., Pandey, P., Kang, S.C. and Maheshwari, D.K.Rhizobia.(2003). as a biological control agent against soil borne plant pathogenic fungi.Ind J Exp Biola; 41: 1160-1164.
- Dinesh, R., Anandaraja, M., Kumarb, A., Binia, Y.K., Subilaa, K.P., Aravind, R., (2015).Isolation, characterization, and evaluation of multi-trait plant growth promoting rhizobacteria for their growth promoting and disease suppressing effects on ginger.Microbiological Research, 173, 34- 43.
- Dobrzyński,J., et al. (2023). Biocontrol of fungal phytopathogens by *Bacillus pumilus*.Frontiers in Microbiology, 14, 1194606.
- Drouin. (2005). Etude de production de protéases alcalines par *Bacillus licheniformis* en utilisant des boues d'épuration municipales comme substrat. Mémoire présentée pour l'obtention du grade de maître ès sciences. Institut national de la recherche scientifique INRS-centre Eau, Terre et Environnement.95 p.

E

- Ekunsaumi, T.(2002). Laboratory Production and Assay of Amylase by Fungi and Bacteria. (accessed 15.05.2016).
- Elnahal, A. S., El-Saadony, M. T., Saad, A. M., Desoky, E. S. M., El-Tahan, A. M., Rady, M. M., ... & El-Tarabily, K. A. (2022). The use of microbial inoculants for biological control, plant growth promotion, and sustainable agriculture: A review. *European Journal of Plant Pathology*, 1-34.
- Etebarian H.R., Sholberg P.L., Eastwell K.C et Sayler R.J. (2005). Biological control of apple blue mold with *Pseudomonas fluorescens*. *Canadian Journal of Microbiology*. 51: 591-598.

F

- Fan, B., Blom, J., Klenk, H.-P., & Borriss, R. (2017). *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus velezensis*, and *Bacillus siamensis* form an “Operational Group *B. amyloliquefaciens*” within the *B. subtilis* species complex. *Frontiers in Microbiology*, 8, 22.
- Fan, B., et al. (2021). *Bacillus velezensis*: A metabolically versatile bacterium for plant health. *Frontiers in Microbiology*, 12, 638676.
- Farhan H.N., Abdullah B.H. et Hameed A.T. (2010). The biological activity of bacterial vaccine of *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas fluorescens* isolates to protect sesame crop (*Sesamum indicum*) from *Fusarium* fungi under field conditions. *Agriculture and Biology Journal of North America*. 1(5): 803-811.
- Fayaz A., et al. (2021). Phylogeny and Optimization of *Trichoderma harzianum* for Chitinase Production: Evaluation of Their Antifungal Behaviour against the Prominent Soil Borne Phyto-Pathogens of Temperate India. *Microorganisms*, 9(9), 1962.
- Firlej.A et Vanoosthuyse. (2001). La lutte intégrée et l'exemple de la punaise translucide : un auxiliaire promoteur pour la pomiculture au Québec. *Vertigo- la revue électronique des sciences de l'environnement*. 2(2).
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO).(2021). The State of the World's Biodiversity for Food and Agriculture.
- Frate, C. A., Davis, R. M., (2007). Alfalfa diseases and management. University of California Agriculture and Natural Resources.

G

- Ghaemi, N., Gholami, A., Niknam, V., Etemadi, M., Asghari, H.R. (2023). Antifungal volatile organic compounds produced by bacteria isolated from rhizosphere soil suppress *Aspergillus niger* growth. *Biocontrol Science and Technology*, 33(1), 56–72.
- Glare, T. R., Caradus, J. R., Gelernter, W. D., Jackson, T. A., Keyhani, N. O., Köhl, J., Marrone, P. G., Morin, L., & Stewart, A. (2012). Have biopesticides come of age? *Trends in Biotechnology*, 30(5), 250–258.
- Gonita-Mishra, I., Sapre, S., Sharam, A., Tiwari, S. (2016). Alleviation of Mercury Toxicity in Wheat by the Interaction of Mercury-Tolerant Plant Growth Promoting Rhizobacteria. *Journal of Plant Growth Regulation*. 35, 1000-1012.
- González, A. M., et al. (2021). Insecticidal Effect of Entomopathogenic Nematodes and the Cell-Free Supernatant of Their Symbiotic Bacteria. *Microorganisms*, 9(11), 2394.
- Gupta M. R., (2004), Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 64(6):763-81.
- Gupta, S., & Pathak, B. (2020). Mycoremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Abatement of Environmental Pollutants*, 127–149. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-818095-2.00006-0>
- Guyader Sebastien. (2020). Maladies cryptogamiques : méthodes de lutte. Master biologie-santé. hal-02791127.

H

- Haas, D., & Défago, G. (2005). Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent *pseudomonas*. *Nature Reviews Microbiology*, 3(4), 307–319.
- Halimursyadah, H., Syafruddin, S., Syamsuddin, S., & Sriwati, R. (2023). Screening of indigenous Rhizobacteria isolates from Patchouli .
- Hamlaoui, S., Benamer, K., (2018). Etude comparative de quelques paramètres morphologique et biochimique chez sept variétés de blé dur (*Triticum durum*. Desf) dans la région de Constantine. Mémoire Master : Biologie et physiologie de la reproduction végétale. Constantine : Université des Frères Mentouri Constantine1, 76p.
- Han J, Sun L, Dong X, Cai Z, Sun X, Yang H, Wang Y, Song W. (2005). Characterization of a novel plant growth-promoting bacteria strain *Delftia tsuruhatensis* HR4 both diazotroph and a potential biocontrol agent against various plant pathogens. *Syst Appl Microbiol* 28(1): 66-76.
- Harman, G. E., Howell, C. R., Viterbo, A., Chet, I., & Lorito, M. (2004). *Trichoderma* species—opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Reviews Microbiology*, 2(1), 43–56.

- Hawksworth, D. L., &Lücking, R. (2017). Fungal diversity revisited: 2.2 to 3.8 million species. *Microbiology spectrum*, 5(4), 5.4. 10.
- Heit, S. (2015). Identification de *Fusarium* et Détection des mycotoxines associées par MALDI-TOF. Thèse d'Université de Lorraine, Faculté de Pharmacie .P13-116.
- Hélène JP (2010). Bactéries pathogènes et environnement. Laboratoire de Bactériologie, CHU Montpellier. 33p
- Houbraken J H., Kocsubé S., Visagie C M., Yilmaz N., Wang X C., Meijer M., Kraak B., Hubka V., Bensch K., Samson A R., Frisvad J C. (2020). Classification of *Aspergillus*
- Hough, B., Steenkamp, E., Wingfield, B., & Read, D. (2023). Fungal Viruses Unveiled: A Comprehensive Review of Mycoviruses. *Viruses*, 15(5), 1202.
- Houissa, H. (2020). Les Mycotoxines du mil: occurrence et flore fongique, Université Montpellier; Université de Tunis El-Manar. Faculté des Sciences

I

- Islam M.T et Hossain M.M. (2013). Biological control of perono streptomycete phytopathogen by bacterial D.K (eds). *Bacteria in agrbiology: Disease Management*. 176-218.

J

- Jadhav, H. P. Shaikh, S. S., & Sayyed, R. Z. (2017). Role of Hydrolytic Enzymes of Rhizafors in Mocontrol of Fungal Phytopathogens: An Overview. In S. Mehnaz (Ed.). *Rhizotrophs Plant Growth Promotion to Bioremediation* (p. 183-203), Springer.
- Jamali F., Shi-Tehrani A., Lutz M.P. et Maurhofer M. (2009).Influence of Host Plant Génotype, Presence of a pathogen, abd Coinoculation with *Pseudomonas Fluorescens* Strains on the rhizosphere exprssion of hydrogen Cyanide-and 2,4-Diacetylphologlucinol biosynthèsis Genes in *P.fluorescens* biocontrol Strain CHO.*Microb Ecol*.57 :267-275.
- Jaradat Z., Dawagreh A., Ababneh Q. and Saadoun I. (2008). Influence of cultureconditions on cellulose production by *Streptomyces* sp. (strain j2). *Jordan journal of biological sciences*.1: 141-146.
- Jemni, M., Maaroufi, A., Mejri, S. (2009). Caractérisation et optimisation des conditions de croissance d'un biopesticide bactérien. *Revue des Régions Arides*. Jerba, Tunisie, 1367-1370.
- Jousset A., Lara E., Wall L.G. and Valverde C. (2006). Secondary Metabolites Help Biocontrol Strain *Pseudomonas fluorescens* CHA0 To Escape Protozoan Grazing, *Appl. Environ. Microbiol*, 72 11: 7083-7090.

K

- Kachhap, S.W.E.T.A., Chaudhary, A.N.I.T.A.,et sing, S.D. (2015).Response of plant growth promoting rhizobactéria(pgpr) in relation to elevated temperature conditions in groundnut (*Arachis hypogaea* L). The Zcoscan, 9 (3and4), 771-778.
- Kamali, M., Guo, D., Naeimi, S., & Ahmadi, J. (2022).Perception of Biocontrol Potential of *Bacillus inaquosorum* KR2-7 against Tomato *Fusarium* Wilt through Merging Genome Mining with Chemical Analysis.Biology, 11(1), 137.
- Kavitha, T., Nelson, R., & Jesi, S. (2013).Screening of rhizobacteria for plant growth promoting traits and antifungal activity against charcoal rot pathogen *Macrophomina phaseolina*.International Journal of Pharma and Bio Sciences, 4.B177-B186.
- Knudsen G. R.,Dandurand L. (2013). Phytopathologie: l'étude de la Santé des Plantes. Université d'Idaho, 4-5p.
- Krajewska B. (2009).” Urease i. Funcional, catalytic and kinetic properties: A 604 review.” Journal of molecular catalysis B: Enzymatic. 59(1-3): 9-21.

L

- Lafkir, S., Mahbous, A. (2018) : Activités enzymatiques des bactéries rhizosphériques de deux plantes médicinales (*Matricaria chamomilla* et *Rosmarinus officinalis*), 22-45.
- Landa,B. B., Hervas, A., Bethiol, W., Jimenez-Diaz, R.M. (1997). Antagonistic Activity of bactéria from the chickpea rhizosphere againt *Fusarium oxysporum*. Phytoparasitica, 25, pp. 305-318.
- Lei, Y., Pu, N., & Zhang, H. (2025). *Aspergillus* Genus as a Prolific Source of Bioactive Metabolites for Agricultural Applications.In Fungal Metabolites for Agricultural Applications (pp. 199–216).Springer.
- Lepoivre, P. 2(003) - Phytopathologie. Editions De Boeck Université, Belgique, 427 p.
- 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(10), 2029-2059.
- Limal, D., Roussos, S., García-Cárdenas, F., Viniegra-González, G., & Saucedo-Castañeda, G. (1999). Biocontrol of plant pathogenic fungi by yeasts: Potential role of *Rhodotorula glutinis*. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 15(3), 249–252.
- Lorck, H. (1948).Production of hydrocyanic acid by bacteria.Physiologia Plantarum, 1(2), 142-146.

M

- Madian, N., Meharzi, N. (2020). Potentialités fongicides des huiles essentielles de *géranium rosat* (Famille des Géraniacée) contre *Aspergillus niger* (Famille des trichocomaceae) agent
- Magan N and Olsen M. (2004) Mycotoxines in food: Detection and control. F.Sc. Technol.p:190-203.

- Marrone, P. G. (2019).Pesticidal natural products – status and future potential.Pest Management Science, 75(9), 2325–2340.
- Marschner P. et Timonen S. (2006). Bacterial community composition and activity in rhizosphere of roots colonized by *arbuscular mycorrhizalfungi*.In Mukerji KG, Manoharachary C, Singh J. (Eds), Micobiam activity in the rhizosphere, Soil Biol. 7: 139-154.

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

- Matthew J.J., Vazhacharickal P.J., Sajesh hkumar NK and Ashokan A. (2016). Amylase production by *Aspergillus niger* through submerged fermentation using starchy food byproducts as substrate. International journal of herbal medicine. 4(6): 34-40.

- Medeiros, F. H. V., Bettiol, W., & Maffia, L. A. (2021).Microbial interactions as a tool for plant disease suppression. Current Opinion in Microbiology, 59, 22–28.

- Meyer J R. (2003). Pest control tactics chap 19. Department of entomology NC state university

- Mihoubi A., (2021): L'étude des maladies fongiques affectant les cultures agricoles dans les régions de zygod Youssef – BaniHumaidan(Constantin), Mémoire Master, Université des Frères Mentouri Constantine 10, 121 pages.

- Miloud Y. (2018). Etude du potentiel bénéfique des souches de *Rhizobium* pour *Medicagotruncatula*: symbiose, solubilisation du phosphate et lutte contre la verticilliose.thèse de doctorat. L'université de toulouse.p146.

- Morcia C., Mehani M., Salhi N., Nazari L., Khelil L., Bara A., Ghizzoni R., and TerziV. (2015). on the role of natural compounds in mycotoxigenicfungi.Cotrol the Battle Against Microbial Pathogens. A. Méndez-Vilas.

- Morin O. (1994). *Aspergillus* et aspergilloses: biologie, Ed. Techniques Encyl. Med. Chir. (Elsevier, Paris), Maladies infectieuses 8-600-A-10.

- Mostafalou, S., & Abdollahi, M. (2017). Pesticides: an update of human exposure and toxicity. Archives of Toxicology, 91(2), 549–599.

- Mota MS, Gomes CB, Souza Júnior IT, Moura AB. (2017) Bacterial selection for biological control of plant disease: criterion determination and validation. Braz J Microbiol 48(1):62–70.

- Müller, D. B., et al., (2013). The soil microbiome: structure, function and implications for plant growth. *Environmental Microbiology*, 15(1), 17–27.
- Munimbazi, C., & Bullerman, L. B. (1998). Isolation and partial characterization of antifungal metabolites of *Bacillus pumilus*. *Journal of Applied Microbiology*, 84(6), 959-968
- Munkvold, G., P. (2017). *Fusarium* species and their associated mycotoxins. *Methods Mol. Biol.* 1542:51-106.
- Muthulakshmi, C., Gomathi, D., Kumar, D.G., Ravikumar, G., Kalaiselvi, M., Uma, C. (2011). Purification and Characterization of Protease by *Aspergillus flavus* under Solid State Fermentation. *Journal of Biological Sciences Production*, 4(3), 137-148.

N

- Nabti, E. H., Bensidhoum, L., Tabli, N., Dahel, D., Weiss, A., Rothballer, M., Schmid M., Hartmann, A. (2014): Growth stimulation of barley and biocontrol effect on plant pathogenic fungi by a *Cellulosimicrobium* sp. Strain isolated from salt-affected rhizosphere soil in north western Algeria. *European Journal of Soil Biology*, 61, 20-26.
- Nasraoui , B. (2006). Les champignons parasites des plantes cultivées, biologie, systématique, pathologie, maladies. Centre de publication universitaire, Tunisie. P 456.
- Nermeen A.E., Hanan A., Gehan M.A., Hassan A.H.I et Nabil M.K.E.(2010). Optimization, Economization and characterization of cellulose produced by marine *Streptomyces ruber*, Africa journal of biotechnology.9: 6355-6364.
- Nguyen, M.T. (2007). Identification des espèces de moisissures, potentiellement productrices de mycotoxines dans le riz commercialisé dans cinq provinces de la région centrale du vietnam : étude des conditions pouvant réduire la production des mycotoxines. Thèse doctorat, université de toulouse, France.147p.
- Nollet, L. M., & Rathore, H. S. (2015). *Biopesticides handbook*: CRC Press.
- Nouveau Knoden D., Meniger G.,(2024). Liste des méthodes de lutte en désherbage des prairies - Phytos autorisés jusqu'au 29/08/2024 7 p.
- Nyongesa, B. W., Okoth, S., & Ayugi, V. (2015). Identification Key for *Aspergillus* species isolated from maize and soil of nandi county, Kenya. *Advances in Microbiology*, 5(04), 205.

O

●Orlici, Z., Benkara, O., (2018). Contribution à l'étude de la flore fongique des semences de blé dur de campagne dans la région Nord de Constantine. Mémoire Master : Microbiologie. Constantine : Université des Frères Mentouri Constantine1, 83p.

P

●Pal, M., Dave, P, and Manna, A. K. (2014).Emerging role of *Aspergillus flavus* in human and animal disorders.Journal of Mycopathological research. 52: 211-216.

●Perfect J. R., Cox G. M., Lee J. Y., Kauffman C. A., Chapman S. W., Morrison V.A.(2001). The Impact of Culture Isolation of *Aspergillus* species: A Hospital-Based Survey of Aspergillosis. 33: 1824–1833.

●Piacibello, A. (2021). Le biocontrôle et la lutte biologique intégrée. Dans Société Nationale d'Horticulture de France (Éd.), Santé des plantes : mieux les protéger dans leur environnement (pp. 31–39). SNHF.

●Pimentel, D. (2005).Environmental and economic costs of the application of pesticides primarily in the United States. Environment, Development and Sustainability, 7(2), 229–252.

●Pujari, J. D., Yakkundimath, R., Byadgi, A. S. (2015). Image processing based detection of fungal diseases in plants. Procedia Computer Science, 46, 1802-1808.

R

●Rai A., Bensidhoum, L., Tabli, N., Bouaoud, Y., Naili, F., Cruz, C., Nabti, E. (2016).A *Pseudomonas* Protegens with High Antifungal Activity Protects Apple Fruits Against *Botrytis cinerea* Gray Mold. International Journal of Scientific Research in Science and Technology, 2(6): 227-237.

●Ramette, A., Frapolli, M., Défago, G., Moëne-Loccoz, Y., (2003).Phylogeny of HCN Synthase-Encoding hcnBC Genes in Biocontrol *Fluorescens Pseudomonas* and Its Relationship with Host Plant Species and HCN Synthesis Ability, Molecular Plant-Microbe Interactions, 16(6), 525- 535.

●Ramnath L., Sithol B., Govinden R., (2016), Classification of lipolytic enzymes and their biotechnological application in the pulping industry: A review .Canadian Journl of Microbiology (3) : 3-20.

●Rawlings N. D. (2020). Twenty-five years of nomenclature and classification of proteolytic enzymes. Biochimica et biophysica acta. Proteins and proteomics, 1868(2), 140345.<https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2019.140345>

●Ray, M., Ray, A., Dash, S., Mishra, A., Achary, K. G., Nayak, S., Singh, S. (2017). Fungal disease detection in plants: Traditional assays, novel diagnostic techniques and biosensors. Biosensors and Bioelectronics, 87, 708-723.

- Reetha, S., Bhubaneswar, G., Thamazhiniyan, P., Mycin. T.R.(2014). Isolation of indole acetic acid (IAA) producing rhizobacteria of *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis* and enhance growth of onion (*Allium cepa* L.). International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences, 3(2), 568-574.
- Richardson, M. D., & Warnock, D. W. (2012). Fungal infection: diagnosis and management: John Wiley & Sons.
- Riera, J., Davyt, D., Durán, R., Iraola, G., Lemanceau, P., & Balsa, N. (2023). An antibiotic produced by *Pseudomonas fluorescens* CFBP2392 with antifungal activity against *Rhizoctonia solani*. Frontiers in Microbiology, 14, 1286926.
- Rijavec T, Lapanje A, (2016). Hydrogen Cyanide in the rhizosphere: not surprising plant pathogen, but rather regulating availability of phosphate. Front Microbiol. 7, 1785.
- Roberti R, Zakrisson E, Flamigni F, De Vero L, Cesari A. (2002). Antagonistic fungi producing hydrolytic enzymes, active in degrading the cell wall of some foot rot pathogens (*Fusarium* spp.) of wheat. J Plant Dis Protect 109 (1):101–108.
- Rouag, N., (2017). Méthode de lutte et risques. Sétif : Université Ferhat ABBAS Sétif 1, 35p.

S

- Saharan, B.S., Nehra, V. (2011). Plant Growth Promoting Rhizobacteria. A Critical Review. Life Sciences and Medicine Research, 2011, LSMR-21.
- Savita, Sharma, A. (2019). Fungi as Biological Control Agents. Biofertilizers for sustainable Agriculture and Environment. Soil Biology. 55, 395-411.
- Schneider, D. J., & Ghabrial, S. A. (2024). A biocontrol perspective on mycoviruses in fungal pathogen management. Journal of Plant Diseases and Protection, 132, Article 43.
- Schwarz W.H. (2001). The cellulosome and cellulose degradation by anaerobic bacteria. Appl Microbiol Biotechnol. 56: 634-649.
- Senthilkumar R. et Selvakumar G. (2008). Isolation and Characterization of an Extracellular Lipase Producing *Bacillus* sp. SS-1 from Slaughterhouse Soil. Advanced Biotech. p. 24-25.
- Si Amar H., (2017). Application des bacilles thermophiles dans la lutte biologique.
- Siddiqui, R., & Khan, N. A. (2012). Biology and pathogenesis of *Acanthamoeba*. Parasites & Vectors, 5, 6.
- Siddiqui, Z. A. (2006). PGPR: Biocontrol and Biofertilization. Springer, Dordrecht.
- Singh, M., Singh, D., Gupta, A., Pandey, K.D., Singh, P.K., 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.

●Sirko Agnieszka, and Brodzik Robert.(2000). Plant Ureases: Roles and Regulation. Acta Biochimica Polonica.Institute of Biochemistry and Biophysics, Polish Academy of Sciences, Vol. 47 No. 4/2000.1189–1195.

●Solanki, P., Putatunda, C., Kumar, A., Bhatia, R., & Walia, A. (2021). Microbial proteases: ubiquitous enzymes with innumerable uses. 3 Biotech, 11(10), 428.<https://doi.org/10.1007/s13205-021-02928-z>

●Souza, R. G., A. C. Gomes, et al.,(2015). "Nuts and legume seeds for cardiovascular risk reduction: scientific evidence and mechanisms of action." Nutrition reviews 73(6): 335-347

●Stenberg, J. A. (2017).A conceptual framework for integrated pest management. Trends in Plant Science, 22(9), 759–769. .

●Storey, E., Dangmank; K. H., Schenck, P. (2004). Guidance for clinicians on the recognition and management of health effects related to mold exposure and moisture indoors. Farmington, University of Connecticut Health Center.

●Swain, M., et Ray, R.C. (2009).Biocontrolle and other beneficial activities of *Bacillus Sublis* isolated from cowdung microflora. Microbiological resarch, 164(2), 121-130.

T

●Tabli N, Nabti EH, Dahel D, Mokrane N, Manyani H, Dary M, et Megias M G.(2013). Impact of diazotrophic bacteria on germination and glowth of tomato, wiyh bio-control effect, isolated from Algerian soil. J.Eco.Heal.Env.Vol.1, 19-25.

●Tabli, N. (2018). Isolement de bactéries à partir des milieux aquatiques productrices des substances antifongiques. Thèse de doctorat. Microbiologie appliquée. BejaiaAlgérie. 207: 193-197.

●Tabli, N., & Nabti, E. (2020).Isolation of bacteria producing antifungal substances from aquatic environments.EC Nutrition, 15(3), 1–6.

●Tabli, N., Bouacem, K., Amira, A. R., Sabrina, N. A. (2023). Selection of a Well Water Bacterial Isolate with Antifungal Activity and its Application to Protect Tomato Fruits Against *Aspergillus niger* Black Mold. Adv Envi Wast Man Rec, 6(3), 490-4.

●Tabli, N., Rai, A., Bensidhoum, L., Palmieri, G., Gogliettino, M., Cocca, E., Consiglio, C., Cillo, F., Bubici, G., Nabti, E.H. (2018): Plant growth promoting and inducible antifungal activities of irrigation well waterbacteria. Biological Control, 117, 78-86.

●Tannous, J. (2015).Patuline, mycotoxine de *Penicillium expansum*, principal pathogène post-récolte des pommes : nouvelles données sur sa biosynthèse et développement d’approches

préventives. Thèse de doctorat, université de Toulouse, Ecole Doctorale Science Ecologique, Vétérinaires, Agronomique et Bioingénieries, France. 208p

- Trivedi, P., Panday, A., Palni, L. M. S. (2008). In vitro evaluation of antagonistic properties of *Pseudomonas corrugate*. Microbiological Research. 163, (3), 329-336.
- Twisha, P., Desai, P.B. (2014). Study on Rhizospheric microflora of Wild and Transgenic varieties of *Gossypium* species in Monsoon. Res. J. Recent. Sci, 3, 42-51.

U

- Undersander, D., Cosgrove, D. (2011). Alfalfa management guide. American Society of Agronomy Crop Science Society of America Soil Science Society of America.

V

- Vidyalakshmi.R, Paranthaman.R and Indhumathi.J. (2009). Amylase Production on Submerged Fermentation by *Bacillus* spp. World Journal of Chemistry. 4 (1): 89-91.
- Visagie, C. M., Houbraken, J., Frisvad, J. C., Hong, S. B., Klaassen, C. H W., Perrone, G., Seifert, K. A., Varga, J., Yaguchi, T., Samson, R.A. (2014). Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*. Studies in Mycology, 87(1), 343-371.
- Vranova, V., Rejsek, K. & Formanek.P. (2013). Proteolytic activity in soil: A review. Applied Soil Ecology, 70, 23-32. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2013.04.003>.

W

- Walia, A., Putatunda, C., Sharma, R., Sharma, S., & Thakur, A. (2021). Biocontrol: A Sustainable Agricultural Solution for Management of Plant Diseases Microbial Biotechnology in Crop Protection (pp. 1-54): Springer.
- Webster, J., & Weber, R. (2007). Introduction to fungi: Cambridge university press.
- Wenke K, Wanke D, Kilian J, Berendzen K, Harter K et Piechulla B. (2012), Volatiles of two growth-inhibiting *thuzobacteria* commonly engage AtWRKY18 function The Plant Journal 70, 445-459.

Y

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

- You, W., Ge, C., Jiang, Z., Chen, M., Li, W., & Shao, Y. (2021). Screening of a broadspectrum antagonist-*Bacillus siamensis*, and its possible mechanisms to control postharvest disease in tropical fruits. *Biological Control*, 157, 104584.

Z

- Zhang, S., et al. (2023). Significance of soil siderophore-producing bacteria in evaluation and elevation of crop yield. *Horticulturae*, 9(3), 370.
- Zin, N.A., & Badaluddin, N.A. (2020). Biological Functions of *Trichoderma* spp. for Agriculture Applications. *Annals of Agricultural Sciences*, 65, 168–178.

Annexe I : Composition des milieux de culture utilisés (pour un litre de milieu)**➤ Potato Dextrose Agar (PDA)**

Composition	Quantité (g)
Pomme de terre	200
Glucose	20
Agar	15
pH	6.7

➤ Gélose Trypticase Soja Agar (TSA)

Composition	Quantité(g)
Agar	15
Peptone de caséine	15
Peptone de soja	5
NaCl	5
Eau distillée	1
pH	7

➤ Plat Count Agar (PCA)

Composition	Quantité(g)
Peptone-protéase	10
Infusion de cervelle de veau	12,5
Infusion de cœur de bœuf	5
Glucose	2
Chlorure de sodium	5
Hydrogénophosphate de sodium	2,5
pH	7,4

➤ **Gélose nutritive (GN)**

Composition	Quantité(g)
Peptone	5
Extrait de viande	1
Extrait de levure	2
NaCl	5
Agar	7.5
pH	7.2±0.2

➤ **Bouillant nutritif (BN)**

Composition	Quantité(g)
Peptone	10
Extrait de viande	5
Chlorure de sodium	5
pH	7.2±0.2

Annexe II : Produits chimiques utilisés (Solutions et réactifs utilisés)

-Picrate de sodium	-Tween 80
-Réactif de Nessler	-Tween 20
-Rouge de Congo	-Eau Peptonée
-Solution de Lugol	-Eau physiologique,
-Eau distillée	- Solution NaCl
- Alcool	

Annexe III : Appareillage

-Autoclave	- Hôte
-Etuve	- Bain marie
-Plaque chauffante-	- Balance
-pH-mètre	

Résumé

Les agents phytopathogènes sont la principale cause de maladies des plantes dont la gravité peut être atténuée par les agents de biocontrôle. 29 isolats bactériens sont obtenus à partir d'échantillons d'eau de puits agricole situé à Djebira-Béjaia. La plupart des isolats ont inhibé la croissance de trois champignons phytopathogènes à savoir ; *Aspergillus niger*, *Penicillium* sp et *Fusarium* sp, avec des PGI allant de 32% à 78,5% à l'égard d'*Aspergillus niger*, 15% à 77,5% à l'égard de *Penicillium* sp et 6% à 65% pour *Fusarium* sp. Tous les isolats sont aussi testés pour leur capacité à produire des métabolites d'intérêt agricole : production d'enzymes lytiques, production d'HCN et d' NH_3 . La production de substances antifongiques de nature volatile a été recherchée sur les 10 meilleurs isolats précédemment testés cette fois-ci à l'égard d'*Aspergillus niger*. Les isolats A1 et A2 montrent les meilleurs résultats pour les activités précédentes sont sélectionnés pour évaluer leur capacité à réduire la pourriture noire causée par *A. niger* sur fruits de tomate. Les résultats ont montré une réduction de surface de lyse de $6,89 \pm 0,96 \text{ cm}^2$, et $7,58 \pm 0,96 \text{ cm}^2$ pour les deux isolats A1 et A2 respectivement. Les résultats obtenus dans cette étude ouvrent des perspectives pour l'utilisation des isolats actifs dans le but de protéger la croissance et la santé des cultures.

Mots clés : Puits d'irrigation, isolats bactériens, champignons, biocontrôle, tomate.

Abstract

Phytopathogens are the main cause of plant diseases, the severity of which can be mitigated by biocontrol agents. 29 bacterial isolates were obtained from agricultural well water samples located in Djebira-Béjaia. Most of the isolates inhibited the growth of three phytopathogenic fungi namely; *Aspergillus niger*, *Penicillium* sp and *Fusarium* sp, with PGI % ranging from 32% to 78,5% for *Aspergillus niger*, 15% to 77,5% for *Penicillium* sp and 6% to 65% for *Fusarium* sp. All isolates are also tested for their ability to produce metabolites of agricultural interest: production of lytic enzymes, production of HCN and NH_3 . The production of volatile antifungal substances was investigated on the 10 best isolates previously tested this time against *Aspergillus niger*. Isolates A1 and A2 showing the best results for the previous activities are selected to evaluate their ability to reduce black rot caused by *A. niger* on tomato fruits. The results showed a reduction in lysis area of $6,89 \pm 0,96 \text{ cm}^2$, and $7,58 \pm 0,96 \text{ cm}^2$ for both isolates A1 and A2 respectively. The results obtained in this study open perspectives for the use of active isolates in order to protect the growth and health of crops.

Keywords: Irrigation well, bacterial isolates, fungi, biocontrol, tomato.

المخلص

تعتبر مسببات الأمراض النباتية السبب الرئيسي لأمراض النبات، والتي يمكن التخفيف من شدتها باستخدام عوامل مكافحة الحيوية. تم الحصول على 29 عزلة بكتيرية من عينات المياه من بئر زراعي يقع في جيبيرة-بجاية. وقد نجحت معظم العزلات في تثبيط نمو ثلاثة فطريات مسببة للأمراض النباتية وهي: *Aspergillus niger* و *Penicillium* sp و *Fusarium* sp، مع نسبة PGI تتراوح من 32% إلى 78.5% لـ *Aspergillus niger*، و 15% إلى 77.5% لـ *Penicillium* sp و 6% إلى 65% لـ *Fusarium* sp. وقد تم اختبار جميع العزلات أيضاً لمعرفة قدرتها على إنتاج مستقلبات ذات أهمية زراعية: إنتاج إنزيمات تحليلية، وإنتاج HCN و NH_3 . وقد تم البحث عن إنتاج مواد مضادة للفطريات المتطايرة في أفضل عشر عزلات تم اختبارها سابقاً هذه المرة ضد فطر. أظهرت العزلات A1 و A2 أفضل النتائج للأنشطة السابقة، وتم اختيارهما لتقييم قدرتهما على الحد من العفن الأسود الذي يسببه فطر *A. niger* على ثمار الطماطم. أظهرت النتائج انخفاضاً في مساحة التحلل بمقدار $6.89 \pm 0.96 \text{ سم}^2$ ، و $7.58 \pm 0.96 \text{ سم}^2$ لكلتا العزلتين A1 و A2 على التوالي. تفتح النتائج التي تم الحصول عليها في هذه الدراسة آفاقاً لاستخدام العزلات النشطة لحماية نمو وصحة المحاصيل.

الكلمات المفتاحية: آبار الري، العزلات البكتيرية، الفطريات، مكافحة الحيوية، الطماطم.

Résumé

Les agents phytopathogènes sont la principale cause de maladies des plantes dont la gravité peut être atténuée par les agents de biocontrôle. 29 isolats bactériens sont obtenus à partir d'échantillons d'eau de puits agricole situé à Djebira-Béjaia. La plupart des isolats ont inhibé la croissance de trois champignons phytopathogènes à savoir ; *Aspergillus niger*, *Penicillium* sp et *Fusarium* sp, avec des PGI allant de 32% à 78,5% à l'égard d'*Aspergillus niger*, 15% à 77,5% à l'égard de *Penicillium* sp et 6% à 65% pour *Fusarium* sp. Tous les isolats sont aussi testés pour leur capacité à produire des métabolites d'intérêt agricole : production d'enzymes lytiques, production d'HCN et d' NH_3 . La production de substances antifongique de nature volatile a été recherchée sur les 10 meilleurs isolats précédemment testés cette fois ci à l'égard d'*Aspergillus niger*. Les isolats A1 et A2 montrent les meilleurs résultats pour les activités précédentes sont sélectionnés pour évaluer leur capacité à réduire la pourriture noire causée par *A. niger* sur fruits de tomate. Les résultats ont montré une réduction de surface de lyse de $6,89 \pm 0,96 \text{ cm}^2$, et $7,58 \pm 0,96 \text{ cm}^2$ pour les deux isolats A1 et A2 respectivement. Les résultats obtenus dans cette étude ouvrent des perspectives pour l'utilisation des isolats actifs dans le but de protéger la croissance et la santé des cultures.

Mots clés : Puits d'irrigation, isolats bactériens, champignons, biocontrôle, tomate.

Abstract

Phytopathogens are the main cause of plant diseases, the severity of which can be mitigated by biocontrol agents. 29 bacterial isolates were obtained from agricultural well water samples located in Djebira-Béjaia. Most of the isolates inhibited the growth of three phytopathogenic fungi namely; *Aspergillus niger*, *Penicillium* sp and *Fusarium* sp, with PGI % ranging from 32% to 78,5% for *Aspergillus niger*, 15% to 77,5% for *Penicillium* sp and 6% to 65% for *Fusarium* sp. All isolates are also tested for their ability to produce metabolites of agricultural interest: production of lytic enzymes, production of HCN and NH_3 . The production of volatile antifungal substances was investigated on the 10 best isolates previously tested this time against *Aspergillus niger*. Isolates A1 and A2 showing the best results for the previous activities are selected to evaluate their ability to reduce black rot caused by *A. niger* on tomato fruits. The results showed a reduction in lysis area of $6,89 \pm 0,96 \text{ cm}^2$, and $7,58 \pm 0,96 \text{ cm}^2$ for both isolates A1 and A2 respectively. The results obtained in this study open perspectives for the use of active isolates in order to protect the growth and health of crops.

Keywords: Irrigation well, bacterial isolates, fungi, biocontrol, tomato.

الملخص

تعتبر مسببات الأمراض النباتية السبب الرئيسي لأمراض النبات، والتي يمكن التخفيف من شدتها باستخدام عوامل مكافحة الحيوية. تم الحصول على 29 عزلة بكتيرية من عينات المياه من بئر زراعي يقع في جيبيرة-بجاية. وقد نجحت معظم العزلات في تثبيط نمو ثلاثة فطريات مسببة للأمراض النباتية وهي: *Aspergillus niger* و *Penicillium* sp و *Fusarium* sp، مع نسبة PGI تتراوح من 32% إلى 78,5% لـ *Aspergillus niger*، و 15% إلى 77,5% لـ *Penicillium* sp و 6% إلى 65% لـ *Fusarium* sp. تم اختبار جميع العزلات أيضاً لمعرفة قدرتها على إنتاج مستقلبات ذات أهمية زراعية: إنتاج إنزيمات تحليلية، وإنتاج HCN و NH_3 . وقد تم البحث عن إنتاج مواد مضادة للفطريات المتطايرة في أفضل عشر عزلات تم اختبارها سابقاً هذه المرة ضد فطر. أظهرت العزلات A1 و A2 أفضل النتائج للأنشطة السابقة، وتم اختيارهما لتقييم قدرتهما على الحد من العفن الأسود الذي يسببه فطر *A. niger* على ثمار الطماطم. أظهرت النتائج انخفاضاً في مساحة التحلل بمقدار $6,89 \pm 0,96 \text{ سم}^2$ ، و $7,58 \pm 0,96 \text{ سم}^2$ لكلتا العزلتين A1 و A2 على التوالي. تفتح النتائج التي تم الحصول عليها في هذه الدراسة آفاقاً لاستخدام العزلات النشطة لحماية نمو وصحة المحاصيل.

الكلمات المفتاحية: آبار الري، العزلات البكتيرية، الفطريات، مكافحة الحيوية، الطماطم.

