

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي  
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE  
جامعة 20 أوت 1955- سكيكدة  
UNIVERSITE 20 AOUT 1955- SIKKDA



Faculté des Sciences  
Département des Sciences de la Nature et de la Vie

Mémoire Présenté en Vue de l'Obtention du Diplôme de Master  
Filière : Sciences Biologiques  
Spécialité : Microbiologie appliquée  
Intitulé :

**Lutte biologique contre les phytopathogènes du grenadier  
(*Punica granatum L.*)**

Présenté Par : Saker Amani, Djerrab Chaima

Bounab Mouna, Handah Ines

**Membres de Jury:**

Mme. Ghannam Maya (MCA)	Présidente	Univ. du 20 Août 1955 – Skikda
Mme. Machiaa Leila (MAA)	Promotrice	Univ. du 20 Août 1955 – Skikda
Melle. Boulechfar Safia (MAA)	Examinatrice	Univ. du 20 Août 1955 – Skikda

Année universitaire 2022/2023

## **Remerciement**

Nos remerciements tout d'abord ALLAH de nous avoir permis d'arriver à ce stade de notre vie particulièrement dans notre étude, et de nous avoir donné la force pour réaliser ce modeste travail malgré toutes les circonstances difficiles.

Nous voudrions remercier notre encadreur de mémoire, Mme Machiaa Leila, pour le temps qu'il a consacré à nous apporter les outils méthodologiques indispensables à la conduite de cette recherche, ainsi que sa confiance qu'il nous accordée ont fait progresser énormément ce travail. Nous le remercions profondément pour sa compréhension, sa patience et sa politesse incomparable.

Nous exprimons notre sincère gratitude à Dr. Ghannam de l'honneur qu'il nous fait en acceptant de présider le jury de soutenance.

Nous tenons à exprimer toute nos reconnaissances à Dr. Boulechfar d'avoir accepté de juger à titre d'examineur ce mémoire

Un grand merci à toute équipe de laboratoire 213 de Hall technologique de la faculté des sciences à l'université du 20 août 1955 Skikda, surtout la doctorante Imen de leur grand soutien

Nos remerciements vont également à Madame Kouri Amel la Responsable de jardin botanique ; qui nous a beaucoup aidés, Merci pour votre bonne humeur et votre gentillesse.

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

# *Dédicace*

*Je dédie ce travail à :*

*A celle qui s'est toujours dévouée, qui m'a aidée du mieux, qu'elle pouvait  
pour réussir ;*

*Celle qui m'a accompagné et écouté tout au long de ce parcours périlleux ;  
celle qui a toujours été là dans mes moments de détresse, ma très chère  
mère*

*A celui qui s'est sacrifié pour moi, celui qui m'a toujours encouragé et  
soutenu moralement tout au long de mon parcours, celui qui a toujours  
été présent pour moi, mon très cher père*

*A ma grande sœur ASSIA pour ton soutiens moral et tes conseils précieux  
tout au long de mes études et à ses enfants FARAH et MAJD EDDINE  
A mon très cher frère ABDOU pour ton soutien constant, tu es un frère  
formidable*

*A mes chères sœurs AMEL et SAMAH, ensemble nous avons traversé des  
hauts et des bas, ri et pleuré, mais notre lien indéfectible est resté intact.  
Vous êtes mes rochers, mes alliées, merci pour tout*

*A mon cher fiancé NOUR EDDINE pour ta patience, ton aide je te  
remercie de tout cœur*

*A la mémoire de mes grandes mères puisse leurs âmes reposent en paix que  
dieu vous accueille dans son éternel paradis*

*A mes chers amis : MERIEM, NIHED, MERIEM et RAYANE*

*A mes collègues : CHAIMA, MOUNA et INES*

*A toute la famille Saker et Zaaboub en particulier : mon grand-père, mon  
oncle ABD EL HAK, ma tante AKILA et sa petite fille INES*

*AMANI*

# *Dédicace*

*Tout d'abord, je voudrais remercier le bon et unique Dieu qui,  
Cela ma donnée le courage et la volonté d'affronter. Différentes  
expériences de vie.*

*Je dédie ce travail à mes chers parents, Dahbia, Tahar pour  
leurs sacrifices.*

*Et les encourager tout a long de mes études.*

*A tous mes chers frères : Abd Raouf Ayman.*

*A mes chères sœurs : Asma et son mari Abdallah*

*Et ses enfants, Farah Abdel Ghafour*

*Soumia et son mari Hassan.*

*A mon chéré ami Ikram.*

*A ma Binôme Amani Mouna Ines.*

*A mes chères amies, Lamis Yousra ma tante Nadia et Samia.*

*A tous ceux qui me sont chers. Et dont je n'ai pas cité les noms.*

*Et à ma chère grand-mère de maman qui m'a tant soutenu.*

*Je remercie toute la famille Djerrab et Mosbah.*

*chaïma*

# *Dédicaces*

*A l'aide de DIEU tout puissant, qui trace le chemin de ma vie,  
j'ai pu arriver à réaliser ce modeste travail que je dédie:  
En premier lieu à ma très chère mère celle à qui je souhaite une  
longue vie et bonne santé ;*

*A mon père qui n'a pas cessé de m'encourager.*

*A mes frères et sœurs : Amir ; Mohamed ; Monia ; Soraya ; sa  
marie Sabar et sa fille Loudjaine.*

*A M<sup>me</sup>. Hamra Krouha Dana pour ses conseils, ses  
encouragements et son conseil pendant toute la période de  
formation.*

*A M<sup>me</sup>. Nedjare Chahrazade.*

*À ma binôme : Chaima ; Mona et Amani.*

*À toutes les personnes qui m'estiment.*

*Ines*

# *Dédicace*

*Un grand merci à l'ensemble de ma famille et plus particulièrement à mes parents et mon frère et ma sœur pour leur amour, leur confiance, leurs conseils ainsi que leur soutien inconditionnel qui m'a permis de réaliser les études pour lesquelles je me destine et par conséquent ce mémoire.*

*Mouna*

# Sommaire

Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Résumés	
Introduction .....	1
Chapitre 01 : Synthèse bibliographique	
1 Les agents phytopathogènes .....	3
1.1 <i>Aspergillus</i> .....	3
1.2 <i>Alternaria</i> .....	3
1.3 <i>Colletotrichum</i> .....	4
2 Les agents de bio contrôle .....	4
2.1 <i>Serratia</i> .....	4
2.2 <i>Bacillus</i> .....	5
Chapitre 02 : Matériel et méthodes	
1 Présentation du site d'accueil .....	7
2 Matériel .....	7
2.1 Matériel biologique.....	7
2.2 Matériel expérimentale .....	7
3 Méthodologie de travail .....	8
3.1 Préparation des milieux de cultures et réactifs .....	8
3.2 Echantillonnage .....	9
3.3 Désinfection et séchage .....	11
3.4 Ensemencement des fragments.....	11
3.5 Identification de l'agent pathogène .....	12
3.5.1 Observation macroscopique .....	12
3.5.2 Observation microscopique.....	12
3.6 Identification de l'agent antagoniste .....	12
3.6.1 Préparation des échantillons du sol .....	12
3.6.2 Repiquage et purification .....	13
3.6.3 L'état frais.....	13
3.6.4 Coloration de Gram.....	13
3.6.5 Galerie API 20E .....	14
3.6.6 Teste oxydase .....	16
3.7 Méthodes de bio contrôle .....	16
3.7.1 Bio contrôle à base des extraits naturels .....	16
3.7.2 Bio contrôle à base de micro-organismes .....	17

3.8	Test de biosurfactant.....	18
3.8.1	Production du biosurfactant .....	18
3.8.2	Récupération de biosurfactant.....	19
3.8.3	Test de l'activité antifongique des biosurfactants (méthode des puits) .....	19
3.9	La micro encapsulation.....	20
3.9.1	Synthèse des microbilles d'alginate .....	20
3.10	Test d'antagonisme <i>in situ</i> .....	21
Chapitre 03 : Résultat et discussion		
1	Résultats .....	23
1.1	Le résultat de l'identification des phytopathogènes du grenadier .....	23
1.2	Résultat de l'identification des bactéries antagonistes .....	25
1.3	Résultat du Bio contrôle à base d'extraits naturels.....	29
1.4	Résultat du Bio contrôle à base des microorganismes .....	30
1.5	Résultat du test de l'activité antifongique des bio surfactants.....	33
1.6	Résultats d'encapsulation des billes d'alginate .....	34
2	Discussion .....	36
Conclusion.....		40
Référence bibliographique .....		42

## Liste des abréviations

**S:** Sabouraud

**GN:** Gélose Nutritive

**PDA:** Potato Dextrose Agar

**TYG:** Tryprone Yeast Glucose

**API:** Analytical Profile Index

**ADH :** Arginine D'hydrolase

**LDC :** Lysine Décarboxylase

**ODC :** Ornithine Décarboxylase

**H<sub>2</sub>S :** Sulfure D'hydrogène

**URE :** Uréase

**VP :** Voges-Proskauer

**Cit :** Citrate

**Gel :** Gélatine

**GLU :** Glucose

## Liste des figures

<b>Fig.1</b> : Hall technologique. ....	7
<b>Fig.2</b> : Laboratoire 213. ....	7
<b>Fig.3</b> : Jardin botanique. ....	10
<b>Fig.4</b> : Pied de grenadier malade. ....	10
<b>Fig.5</b> : Les organes du grenadier ((a) fruit, ( b) tronc, (c) branche).....	10
<b>Fig.6</b> : Sol du grenadier.....	11
<b>Fig.7</b> : Sol non infecté.....	11
<b>Fig.8</b> : Désinfection et séchage des organes .....	11
<b>Fig.9</b> : Gélose ensemencée par les fragments des organes du grenadier infectées.....	11
<b>Fig.10</b> : Les écouvillons.....	11
<b>Fig.11</b> : Galerie API 20E. ....	15
<b>Fig.12</b> : L'huile essentielle du romarin.....	17
<b>Fig.13</b> : Méthode de Confrontation directe.....	18
<b>Fig.14</b> : Méthode de Confrontation indirecte.....	18
<b>Fig.15</b> : Les erlenmeyers préparé.....	18
<b>Fig.16</b> : Extraction liquide-liquide.....	19
<b>Fig.17</b> : Méthode d'encapsulation de la souche dans l' alginate de sodium .....	20
<b>Fig.18</b> : Traitement <i>in situ</i> des quatres arbres infectés .....	21
<b>Fig.19</b> : Résultat du S4 sur milieu Hektoene. ....	28
<b>Fig.20</b> : Résultat du galerie API 20 E après 24 heures. ....	28
<b>Fig.21</b> : Résultat du galerie API 20 E après 48 heures. ....	28
<b>Fig.22</b> : Résultat du galerie API 20 E après l'addition des réactifs. ....	28
<b>Fig.23</b> : observation du résultat négatif de test d'oxydase de la souche S4.....	29
<b>Fig.24</b> : Les billes d'alginate dans l'eau physiologique.....	35
<b>Fig.25</b> : Flacons contenant les microbilles.....	35

## Liste des tableaux

<b>Tab.01</b> : matériel et les milieux de cultures utilisées. ....	7
<b>Tab.02</b> : mode opératoire des milieux de culture .....	8
<b>Tab.03</b> : Observations macroscopique des champignons phytopathogènes.....	23
<b>Tab.04</b> : Observations microscopique des champignons phytopathogènes. ....	24
<b>Tab.05</b> : observation macroscopique des boites du sol ensemencé.....	25
<b>Tab.06</b> : description macroscopique des colonies des boites du sol. ....	25
<b>Tab.07</b> : résultat de Repiquage et purification des colonies de bactéries.....	26
<b>Tab.08</b> : Résultats d'observation macroscopique et microscopique des trois souches. ....	26
<b>Tab.09</b> : résultat de la coloration de gram. ....	27
<b>Tab.10</b> : Résultat macroscopique et microscopique du l'effet de Macérats de l'ail.....	29
<b>Tab.11</b> : Résultat de l'activité antifongique de l'huile essentielle de romarin et purin d'ortie. ....	30
<b>Tab.12</b> : Résultat confrontation directe. ....	30
<b>Tab.13</b> : Résultat confrontation indirecte. ....	31
<b>Tab.14</b> : Observations microscopique des boites de confrontation indirecte.....	32
<b>Tab.15</b> : Observations macroscopique et microscopique des boites contient Source de carbone glycérol.....	33
<b>Tab.16</b> : Observations macroscopique et microscopique des boites contient Source de carbone huile.....	34

## Résumé

La présente étude a été effectuée dans le but de lutter contre les phytopathogènes responsables de la maladie du grenadier (*Punica granatum L.*) situé au jardin botanique de l'université de Skikda. Afin d'isoler et identifier les phytopathogènes et les antagonistes appropriés, nous avons suivi une démarche microbiologique classique (mise en culture, observation macro et microscopique et identification). Pour tester les activités antifongiques nous avons utilisé trois types ; utilisation des extraits (ail, romarin, ortie) ; la confrontation directe et indirecte et les biosurfactants. Une approche de micro encapsulation des antagonistes et de leurs biosurfactants a été effectuée pour un traitement *in situ*. Les phytopathogènes isolés appartiennent aux genres *Aspergillus*, *Alternaria* et *Colletotrichum* et les antagonistes aux genres *Bacillus* et *Serratia*. Les résultats des activités antifongiques différent d'un type à un autre, nous pouvons les classer par ordre décroissant du plus efficace au moins efficace ; bactéries, biosurfactants et extraits naturels. Ces résultats suggèrent que les antagonistes bactériens pourraient constituer un moyen potentiel de lutte biologique qui revêt une importance significative, car ils peuvent favoriser l'activité microbienne bénéfique.

**Mots clés :** *Bacillus*, *Serratia*, *Aspergillus*, *Alternaria*, *Colletotrichum*, confrontation, antagoniste.

## Abstract

The present study was carried out with the aim of controlling the phytopathogens responsible for the disease of pomegranate (*Punica granatum L.*) located at the botanical garden of the University of Skikda. In order to isolate and identify the phytopathogens and the appropriate antagonists, we followed a classic microbiological approach (culture, macro and microscopic observation and identification). To test antifungal activities, we used three different approaches: extracts (garlic, rosemary, nettle), direct and indirect confrontation and biosurfactants. The antagonists and their biosurfactants were microencapsulated for in situ treatment. The phytopathogens isolated belong to the genera *Aspergillus*, *Alternaria* and *Colletotrichum*, and the antagonists to the genera *Bacillus* and *Serratia*. The results of the antifungal activities differed from one type to another, and we can rank them in descending order from most to least effective: bacteria, biosurfactants and natural extracts. These results suggest that bacterial antagonists could be a potential means of biological control of significant importance, as they can promote beneficial microbial activity.

**Keywords:** *Bacillus*; *Serratia*; *Aspergillus*; *Alternaria*; *Colletotrichum*; biocontrol; antagonism.

## الملخص

أجريت هذه الدراسة بهدف مكافحة مسببات الأمراض النباتية المسؤولة عن مرض الرمان (*Punica granatum L.*) الموجود في الحديقة النباتية بجامعة سكيكدة. من أجل عزل وتحديد مسببات الأمراض النباتية والمضادات المناسبة، اتبعنا نهجًا ميكروبيولوجيًا كلاسيكيًا (الزراعة والمراقبة الكلية والميكروسكوبية والتحديد). لاختبار الأنشطة المضادة للفطريات استخدمنا ثلاثة أنواع؛ استخدام مقتطفات (الثوم وإكليل الجبل وسماد نبات القراص)؛ المواجهة المباشرة وغير المباشرة والمواد الحيوية. تم تنفيذ نهج التغليف الدقيق للخصوم ومضاداتها الحيوية للعلاج في الموقع. تنتمي مسببات الأمراض النباتية المعزولة إلى أجناس *Aspergillus* و *Alternaria* و *Colletotrichum* ومضادات مع *Bacillus* و *Serratia*. تختلف نتائج الأنشطة المضادة للفطريات من نوع إلى آخر، يمكننا تصنيفها بترتيب تنازلي من الأكثر فعالية إلى الأقل فعالية؛ البكتيريا والمواد الحيوية والمستخلصات الطبيعية. تشير هذه النتائج إلى أن مضادات البكتيريا يمكن أن تشكل وسيلة محتملة للرقابة البيولوجية ذات أهمية كبيرة، لأنها يمكن أن تعزز النشاط الميكروبي المفيد.

**الكلمات المفتاحية:** *Aspergillus ; Alternaria ; Colletotrichum ; Bacillus ; Serratia* ؛ مكافحة البيولوجية.

# **Introduction**

## Introduction

L'agriculture constitue la base de l'économie. Malheureusement celle-ci est soumise à plusieurs contraintes. Les producteurs sont confrontés à diverses maladies qui s'attaquent aux cultures. La majorité des maladies de plantes sont causées par les champignons qui causent des symptômes ; changement de couleur, des altérations des organes, des modifications anatomiques et des altérations des métabolismes (**Aouar, 2012**), leur impact est donc colossal en agriculture, ou ils peuvent réduire sévèrement les rendements et la qualité des produits agricoles (**Robert, 2012**). Les produits chimiques utilisés à l'heure actuelle pour lutter contre les agents phytopathogènes présentent des inconvénients. De ce fait, la lutte biologique contre ces organismes, s'avère très importante. Les micro-organismes utilisés dans la lutte microbiologique appartiennent à plusieurs taxons à savoir les virus, les bactéries et les champignons. Les champignons et les bactéries sont les micro-organismes les plus utilisés (**Sakhar, 2009**).

La lutte biologique offre des potentialités de contrôle des maladies où certains agents antagonistes sont capables de contrôler des maladies contre lesquelles aucun moyen de lutte chimique ou résistance de l'hôte n'existe, et avec moins de contraintes environnementales que les pesticides (**Hanson et Howell, 2002**).

Selon **Garett (1965) cité par Roger (1990)**, « tout facteur réduisant la survie ou l'activité d'un parasite par l'introduction d'un organisme vivant, excepté l'homme, qui diminue des pertes causées par le parasite », c'est l'agent de la lutte biologique. En 1968, l'académie nationale des sciences aux USA donna une définition plus large, c'est « toute action mettant en jeu des organismes ou modifiant l'hôte, y compris les méthodes culturales, qui permettent de diminuer, par voie directe ou indirecte, les dommages causés par un parasite. »

Le principal objectif de cette étude est de se concentrer sur l'isolement et l'identification de ou des agents phytopathogènes ainsi que les agents antagonistes appropriés en outre l'étude vise à évaluer leur activité antifongique.

**Chapitre 01 :**  
**Synthèse bibliographique**

## 1 Les agents phytopathogènes

Plusieurs genres de champignons telluriques sont capables d'infecter les plantes cultivées et de causer des dégâts importants, il s'agit notamment des genres *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* et *Alternaria*... l'ensemble de ces champignons provoquent des maladies cryptogamiques ; ces derniers se définies par une succession de réponses invisibles et/ou visibles à un champignon phytopathogène qui se manifeste par des bouleversements de la forme, de la fonction ou de l'intégrité de la plante. Les maladies cryptogamiques sont facilement transportées par le vent et la pluie qui favorisent le transport des spores des champignons, qui se disséminent et se déposent sur d'autres plantes saines (Agrios , 2005). Parmi les agents phytopathogènes, nous citerons :

### 1.1 *Aspergillus* :

De nombreuses espèces d'*Aspergillus* sont présentes dans l'environnement humain, notamment dans la poussière et l'air (Morin, 1994). La plupart des *Aspergillus* sont des saprophytes, capables de se développer dans le sol (Scheidegger et Payne, 2003).

Les *Aspergillus* poussent rapidement, ils sont poudreux ou duveteux, de couleur variable ; blanc, vert, brun à noir. Ils se caractérisent par la formation d'organes de reproduction asexués ; les têtes aspergillaires. Le conidiophore, de longueur variable, se renfle à son extrémité terminale formant une vésicule globuleuse, à partir de celle-ci se forment des phialides, soit directement, soit par l'intermédiaire de métules. Les phialides forment des conidies unicellulaires, basipétales disposées en chaînettes (Rouviere, 2002).

Ce genre comprend plus de 250 espèces contenant à la fois des espèces pathogènes. Plusieurs espèces sont des agents pathogènes opportunistes des plantes et des animaux (Geiser *et al.*, 2008).

*A niger* est un champignon microscopique qui contamine les récoltes dans les champs ou pendant la conservation dans les silos ou greniers (Pane *et al.*, 2011). Il forme des colonies noires atteignant 4 à 5 cm de diamètre en 7 jours sur milieu Czapek incubé à 25 °C. La colonie est d'abord blanche et translucide puis devient noire en sporulant (Ayesha *et al.*, 2003).

### 1.2 *Alternaria* :

Les *Alternaria* sont des champignons fréquents dans notre environnement. Ils appartiennent aux moisissures atmosphériques. Ils peuvent être isolés de végétaux très divers. *Alternaria* comprend près de 275 espèces (Simmons, 2007) avec des modes de vie saprophytes et phytopathogènes qui peuvent affecter les cultures sur champ ou produits végétaux pendant la récolte et post-récolte (Logrieco *et al.*, 2009). Cependant la majorité des espèces du genre *Alternaria* sont des champignons phytopathogènes inféodés à une famille de plantes ou à une plante spécifiquement.

L'*Alternaria* possèdent des conidies septées avec cloisons transversale, les cellules sont multi nucléées de couleur foncé de taille variable selon les espèces, pour la reproduction de l'*Alternaria*, les formes sexuées sont rarement rencontrées. Pour les caractères culturels de ce genre, la croissance est rapide sur le milieu Sabouraud ou PDA à 25°C - 30°C, la couleur des colonies d'*Alternaria* au départ blanc-gris, devient rapidement foncée (vert foncé à noire) le recto comme au verso, pour la texture est duveteuse et laineuse (**Chabasse et al.,2002**).

### 1.3 *Colletotrichum* :

*Colletotrichum sp.* étaient récemment inclus dans la liste des 10 plus importants champignons pathogènes dans le monde, sur la base de connaissances scientifiques et importance économique (**Dean et al., 2012**). Ils peuvent infecter plus de 30 genres de plantes (**Perfect et al., 1999 ; Damm et al., 2012a, b ; Farr et Rossman , 2017**), provoquant la maladie de l'antracnose et la dégradation post-récolte sur une large éventail de fruits tropicaux, subtropicaux et tempérés, les herbes, les cultures maraîchères et les plantes ornementales (**Bailey et Jeger ,1992 ; Bernstein et al., 1995 ; Freeman et Shabi,1996 ; Crouch et al., 2009 ; Lima et al., 2011 ; Damm et al., 2012a, b ; Anderson et al., 2013 ; Crous et al., 2016 ; Guarnaccia et al., 2016 ; De Silva et al., 2017**). Les champignons de genre *Colletotrichum* produisent des conidies à l'intérieur de fructifications fongiques noires appelées acervules (**Ponte, 1996**). Leur mode de vie saprophyte ou pathogène lorsque les plantes hôtes sont soumis à des conditions de stress, ou placées en stockage post-récolte (**Crous et al., 2016**). La germination pathogène a lieu sur des plantes ou sur une surface hydrophobe et se caractérise par une mitose rapide suivie du développement d'un seul tube germinatif. Ce processus est initié immédiatement et conduit à la formation d'appressoria. La germination saprophyte se produit en milieu riche. Cela prend beaucoup plus de temps et se caractérise par le développement de deux tubes germinatifs qui émergent des côtés opposés de spore. Ces tubes germinatifs ne forment pas d'appressoria, et ces spores germées n'infectent pas les plantes (**Barhoom et Sharon, 2004**).

## 2 Les agents de biocontrôle

Parmi les agents les plus utilisées :

### 2.1 *Serratia* :

Les espèces du genre *Serratia* sont des bactéries anaérobies facultatives (**Grimont et Grimont, 1992**), elles peuvent se développer en présence d'oxygène (aérobie) ou en l'absence d'oxygène (anaérobie) (**Slonczewski et John, 2009**).

Les *Serratia* associées aux plantes comprennent à la fois des endophytes et des espèces libres dans la rhizosphère. De nombreuses espèces de *Serratia* ont la capacité de favoriser la croissance des plantes (PGP), et sont des agents de lutte biologique contre les pathogènes fongiques du sol qui infectent diverses cultures (**Muller et Berg, 2008**).

Les *Serratia* sont des entérobactéries généralement mobiles. Elles donnent parfois des colonies pigmentées en rouges. Les espèces du genre *Serratia* sont des *bacilles* Gram négatif parfois assez fins (**Holt,1994**).

*Serratia marcescens* est une bactérie à Gram négatif appartenant à la famille des Enterobacteriaceae. Cette bactérie est considérée comme un agent prometteur de lutte biologique contre les maladies fongiques des plantes grâce à son activité antifongique élevée (**Fadhil et al., 2014**).

Plusieurs composés antifongiques provenant de *Serratia marcescens* ont été purifiés et caractérisés, tels que la chitinase, la prodigiosine et la protéase. Ces composés attaquent les parois cellulaires des champignons phytopathogènes, provoquant ainsi une lyse cellulaire et une mort ultérieure. De manière intéressante, chaque souche de *Serratia marcescens* peut avoir son propre ensemble de fongicides qui leur permettent de lutter contre différents spectres de champignons (**Someya et al., 2001 ; Giri et al., 2004**).

## **2.2 Bacillus :**

Le genre *Bacillus* est hétérogène, aéro-anaérobie facultatif à Gram positif, formant des spores, mobiles, c'est l'ensemble des micro-organismes aptes à se multiplier à l'air aux températures moyennes, plus précisément ceux dont la température optimale de croissance est située entre 20 et 40°C. Ils peuvent être des micro-organismes pathogènes ou d'altération (**Bougeois et Leveau, 2006**). Les *bacilles* appartiennent à la famille des *Bacillaceae* à l'ordre des *Bacillales*, à la classe *Bacilles (Bacilli)* (**Maughan et Van der Auwera, 2011**).

Les *Bacillus* sont des bactéries ubiquitaires. Ils sont retrouvés dans divers environnements tels que les plantes et sols, les événements hydrothermaux, des environnements extrêmes, l'eau de mer, etc (**Hamdache et al., 2013**).

Une activité antifongique est connue pour les *bacilles spp.* mésophiles, en effet ils sont capables d'inhiber la croissance des champignons phytopathogènes *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia ozyzae*, *Aspergillus niger* (**Pereza et al., 1993**).

**CHAPITRE 02 :**  
**MATERIEL ET METHODES**

## 1 Présentation du site d'accueil

Notre étude a été réalisée au niveau du laboratoire de microbiologie n° 213 du Hall technologique de la faculté de technologie à l'université du 20 août 1955 de Skikda, pendant une période de 2 mois et 13 jours à partir de 22-02-2023 jusqu'au 07-05-2023.



**Fig.1** : Hall technologique.



**Fig.2** : Laboratoire 213.

## 2 Matériel

### 2.1 Matériel biologique

Le grenadier, *Punica granatum*, a été décrit par Linné et introduit dans sa classification en 1753.

Telle est cette classification :

- Embranchement : *Spermaphytes*
- Sous-embranchement : *Angiospermes*
- Classe : *Magnoliopsida*
- Ordre : *Myrtales*
- Famille : *Punicaceae*
- Genre : *Punica*
- Espèce : *Punica granatum L (Spichiger et al., 2004)*.

### 2.2 Matériel expérimentale

Tous les matériels et les milieux utilisés sont récapitulés dans le tableau suivant :

**Tab.1** : Matériel et milieux de cultures utilisés.

<b>Appareils</b>	Microscope optique, Bain marie, Etuve, Bec bunsen, Autoclave, Balance de précision, plaque chauffante avec agitateur magnétique.
<b>Milieux et Réactifs</b>	Gélose Nutritive, Gélose Sabouraud, Gélose potato dextrose agar, Gélose Hektoen, Gélose King B, Gélose Columbia, Eau distillée, Bleu de méthylène, Eau physiologique, Hypochlorite de Sodium (eau de Javel), éthanol, violet de gentiane, Lugol, fuchsine, Tropic algin, Extrait de levure, Glucose, Tryptone Agar, Magnésium sulfate (Hepta) $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , Chlorure de calcium, Huile d'olive, Eau minérale, Huile à immersion, Acétate d'éthyle, Tween 20, Glycérine végétale.
<b>Divers</b>	Anse de platine, Flacon, barreau magnétique, Boite de pétri, Spatule, Tube à essais, Cure dent, Papier Aluminium, Lame et lamelle, Scotch, bécher, Erlenmeyer, seringue 2,5, écouvillon, entonnoir, papier filtre.

### 3 Méthodologie de travail

#### 3.1 Préparation des milieux de cultures et réactifs

Dans notre étude, nous avons utilisé sept (7) milieux de culture : GN, Sabouraud, PDA, Columbia, Hektoen, King B, Bouillon.

Parmi ces derniers six (6) ont été préparé selon le tab.2 et Columbia a été fournie par le laboratoire. Tous les milieux ont été stérilisés à l'autoclave à température 120°C pendant 20 minutes.

**Tab.2** : Mode opératoire.

<b>GN</b>	<b>Sabouraud</b>	<b>King B</b>
Dissoudre 14 g dans 500 ml d'eau distillée. Chauffer la solution jusqu'à l'ébullition avec agitation.	Dissoudre 32,5 g dans 500 ml d'eau distillée. Chauffer la solution jusqu'à l'ébullition avec agitation.	Dissoudre 3,7 g dans 100 ml d'eau distillée. Chauffer la solution jusqu'à l'ébullition avec agitation.

<b>Alginate</b>	<b>Chlorure de calcium</b>	<b>Purin d'ortie</b>
<p>Dissoudre 2 g d'alginate de sodium dans 100 ml d'eau distillée.</p> <p>Chauffer la solution avec agitation jusqu'à dissolution.</p>	<p>Dissoudre 4 g de chlorure de calcium dans 100 ml d'eau distillée.</p> <p>Chauffer la solution avec agitation jusqu'à la dissolution.</p>	<p>Mettre une quantité d'ortie dans un bidon qui contient l'eau de pluie, fermez-le bien et laissez-le pendant une semaine ou plus en remuant chaque 2 jours à l'aide d'un bâton en bois.</p> <p>Filtrons dans un béccher à l'aide d'une compresse stérile.</p>
<b>PDA</b>	<b>Eau physiologique</b>	<b>TYG (bouillon)</b>
<p>Bouillir dans 300 ml d'eau distillée stérile 200 g de pomme de terre épluchée et coupée en petits morceaux jusqu'à ramollissement.</p> <p>Filtrer le bouillon obtenu à travers une compresse stérile</p> <p>Dans un béccher mettre l'extrait de pomme de terre obtenue puis complète avec l'eau distillée stérile jusqu'à 1 L rajouter 20 g du glucose et 20 g d'agar agar.</p> <p>Chauffer la solution jusqu'à l'ébullition avec agitation.</p>	<p>Dissoudre 1,8 g de chlorure de sodium (Na Cl) dans 200 ml d'eau distillée après l'agitation on obtient de l'eau physiologique.</p>	<p>Dissoudre 5 g de tryprone, 3 g d'extrait de levure, 5g glucose, 0,247 g MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O dans 1 L d'eau distillée.</p> <p>Chauffer la solution avec agitation jusqu'à la dissolution.</p>

### 3.2 Echantillonnage

Les prélèvements des échantillons ont été effectués dans le jardin botanique de l'université de Skikda, sur le pied du grenadier (*Punica granatum L.*).



**Fig.3 :** Jardin botanique.



**Fig.4 :** Pied de grenadier malade.

- L'isolement de l'agent pathogène est réalisé à partir des organes malades (fruit, tronc, branche), ont été récoltés, prélevé et recueilli dans des sacs en papier fermés et identifiés.
- L'isolement de l'agent antagoniste est réalisé à partir du sol (sol malade du grenadier, sol non infecté), les échantillons de sols sont collectés à partir d'une profondeur de 3 à 5 cm de la surface du sol débarrassée des feuilles mortes et des débris végétaux.
- L'analyse microbiologique des échantillons se fait dès l'arrivée au laboratoire, toutes les manipulations sont faites dans des conditions aseptique.



(a)



(b)



(c)

**Fig.5 :** Les organes du grenadier (a) Fruit, (b) tronc, (c) branche.



**Fig.6 :** Sol du grenadier



**Fig.7 :** Sol non infecté

### 3.3 Désinfection et séchage

Brièvement, les différents fragments ont été rincés avec de l'eau stérile pendant 30 s, puis rincés avec de l'alcool à 75 % pendant 2 min, puis trempés dans une solution d'hypochlorite de sodium à 2,5 % pendant 5 min, puis enfin rincés avec une grande quantité d'eau stérile arroser trois fois (Liangliang *et al.*, 2023).



**Fig.8 :** Désinfection et séchage des organes.

### 3.4 Ensemencement des fragments

Après le séchage, les fragments sont mis aseptiquement dans les boîtes de Pétri stériles contenant deux milieux de culture (GN, Sabouraud) pour chaque milieu on utilise trois boites pour les trois organes, les boites sont divisées en deux partie, partie pour les organes désinfectés et l'autre pour les organes sans désinfection.



**Fig.9 :** Gélaseensemencée par les fragments des organes du grenadier infectées.

Les boîtes ensemencées ont été incubées à température ambiante avec une lecture quotidienne.

### **3.5 Identification de l'agent pathogène**

#### **3.5.1 Observation macroscopique**

Se base sur les critères suivants :

##### **3.5.1.1 L'aspect des colonies**

Qui représente un critère clef d'identification. Les champignons filamenteux forment des colonies duveteuses, laineuses, cotonneuses, veloutées, poudreuses ou granuleuses.

##### **3.5.1.2 La couleur des colonies**

C'est un élément très important d'identification. Les couleurs les plus fréquentes sont le blanc, crème, jaune, orange, brun allant jusqu'au noir. Les pigments peuvent être localisés au niveau du mycélium (*Aspergillus*, *Penicillium*) ou diffuser dans le milieu de culture (*Fusarium*) (**Botton et al, 1990**).

#### **3.5.2 Observation microscopique**

##### **3.5.2.1 État frais**

La technique de Roth (drapeau) consiste à adhérer à l'aide d'un bout de scotch une fraction mycélienne à partir d'une culture jeune et de la coller sur une lame contenant quelques gouttes de bleu de méthylène.

L'observation se fait sous microscope objectif x 40 (**Chabasse et al. 2002**).

### **3.6 Identification de l'agent antagoniste**

#### **3.6.1 Préparation des échantillons du sol**

- Les échantillons ont été prélevés sur un sol de grenadier et un sol non infecté ;
- Nous prenons deux tubes à essais stérile dans le premier tube nous mettons 1 g du sol de grenadier et dans le deuxième tube nous mettons 1g du sol non infecté, 9 ml d'eau physiologique sont ajoutés dans chaque tube ;
- En agitant les deux tubes pendant 15 minutes, les échantillons sont prêts, donc il faut faire l'ensemencement sur milieu solide, chaque échantillon dans deux boîtes de pétri, l'un contient GN et l'autre Sabouraud ;
- Prélevé à l'aide d'une anse de platine stérile l'inoculum liquide à partir de chaque tube puis ensemencher sur les boîtes en appliquant la méthode par épuisement en stries ;
- Les boîtes sont incubées à l'envers et à l'obscurité à température ambiante avec lecture quotidienne.

### 3.6.2 Repiquage et purification

- Après l'incubation on a sélectionné sept (7) colonies différentes parmi les colonies obtenues dans les quatre (4) boîtes pour faire le repiquage et la purification ;
- Le but du repiquage et purification est de vérifier et d'obtenir des souches pures pour faciliter l'identification ;
- La purification est réalisée par transfert des colonies développées sur des boîtes, chaque colonie récupérée dans une boîte, et dans le même milieu de culture initial ;
- Prélevé à l'aide d'une anse de platine stérile chaque colonie et ensemençer sur les boîtes en appliquant la méthode par épuisement en stries ;
- En laissant les sept (7) boîtes en incubation à température ambiante avec lecture quotidienne ;
- Après l'incubation et l'observation macroscopique des sept (7) boîtes que nous avons préparées, nous avons choisi juste les boîtes qui a montré des colonies pures, ces boîtes sont numérotées 2 et 4 (pour le sol non infecté dans le milieu Sabouraud), 7 (sol du grenadier dans le milieu GN) pour continuer notre étude ;
- les isolats purifiés ont été ensemençée chacun dans un écouvillon rempli de quatre (4) ml de bouillon nutritif puis incubé à température ambiante pendant 24 à 48 h pour les revivifier.



**Fig.10** : Les écouvillons.

### 3.6.3 L'état frais

Une méthode rapide consiste à observer entre lame et lamelle une suspension bactérienne sans fixation préalable par la chaleur ou l'alcool. Il permet l'observation des bactéries vivantes et la détermination de leur morphologie, de leur mode de groupements, leur abondance et leur mobilité.

L'examen direct proprement dit se réalise en déposant, sur la lame une goutte du liquide ou de la suspension microbienne à examiner. Cette goutte est recouverte d'une lamelle. Observer au microscope optique à l'objectif  $\times 40$  (Carbonnelle et al. 1988).

### 3.6.4 Coloration de Gram

La coloration de Gram est la première étape de vérification de la pureté des souches bactériennes, avant de commencer la coloration, un frottis doit être préparé comme suit :

Déposer sur une lame propre une goutte d'eau physiologique stérile ;

Prélever un fragment de colonie à l'aide d'une anse à boucle ;

Dissocier soigneusement la colonie dans la goutte d'eau, puis sécher et fixer le frottis ;

Au-dessus de la flamme de bec benzène sans trop chauffer (**Leyral et Joffin, 2001**).

Une fois refroidi, on entame la coloration de Gram :

- Recouvrir le frottis de la solution de violet de gentiane, laisser agir 1 minute ;
  - Rejeter le colorant, laver à l'eau ;
  - Recouvrir la préparation de Lugol, laisser agir 1 minute ;
  - Rejeter le Lugol, laver à l'eau ;
  - Décolorer à l'alcool 95° pendant 10 secondes ;
  - Rincer à l'eau courante ;
  - Recouvrir la lame de la solution de Fuchsine diluée. Laisser agir pendant 30 secondes à 1 minute ;
  - Laver abondamment à l'eau, égouttée, sécher entre deux feuilles de papier buvard très propres ;
  - recouvrir la lame avec l'huile à immersion ;
  - Observer au microscope objectif à immersion x100 :
- ✓ Les bactéries Gram négatif sont roses.
  - ✓ Les bactéries Gram positif sont de coloration violette (**Bourdon et al. 1981**).

### 3.6.5 Galerie API 20E

#### 3.6.5.1 Principe

Le Système d'Identification API 20E est utilisé pour l'identification des entérobactéries et d'autres *bacilles* Gram négatif qui poussent facilement. Le système consiste en une galerie de 20 micro-tubes contenant les substrats déshydratés. Les micro-tubes sont inoculés avec une suspension bactérienne.

#### 3.6.5.1 Mode opératoire

- Préparation de la galerie :

Réunir fond et couvercle d'une boîte d'incubation et répartir environ 5ml d'eau distillée stérile dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide ;

Inscrire la référence de la souche sur la languette latérale de la boîte ;

Sortir la galerie de son emballage ;

Déposer stérilement la galerie dans la boîte d'incubation.

- Préparation de l'inoculum :

Préparer une suspension bactérienne dans 10 ml d'eau physiologique stérile à partir d'une culture pure et jeune sur milieu Hektoen puis mettez dans l'étuve 37°C pendant 1 heure.

- Ensemencement de la galerie API 20E :

Introduire la suspension bactérienne dans chaque tube à l'aide d'une pipette Pasteur stérile, pointe appuyée à l'intérieur et sur le côté pour éviter la formation de bulles d'air ;

Pour les caractères soulignés ADH, LDC, ODC, H<sub>2</sub>S, URE, ensemercer le tubule par la suspension et la cupule par l'huile de vaseline stérile ;

Pour les caractères encadrés VP, CIT, Gel, ensemercer le tubule et la cupule par la suspension ;

Pour les caractères non encadrés, non soulignés ensemercer uniquement le tubule par la suspension.

### 3.6.5.3 Lecture de la galerie

Après incubation, la lecture de la galerie doit se faire en se référant au tableau de lecture.

Si trois tests ou plus (test GLU + ou -) sont positifs, noter sur la fiche de résultats toutes les réactions spontanées puis révéler les tests nécessitant l'addition de réactifs :

- Test TDA : ajouter une goutte de réactif TDA. Une couleur marron-rougeâtre indique une réaction positive à noter sur la fiche de résultats.
- Test IND : ajouter une goutte de réactif JAMES. Une couleur rose diffusant dans toute la cupule indique une réaction positive à noter sur la fiche de résultats.
- Test VP : ajouter une goutte de réactif VP1 et VP2. Attendre au minimum 10 minutes. Une couleur rose ou rouge indique une réaction positive à noter sur la fiche de résultats. Une faible coloration rose apparaissant après 10 minutes doit être considérée négative.
- Note : le test de la recherche de production d'indole doit être réalisé en dernier, car cette réaction libère des gaz qui risquent d'altérer l'interprétation d'autres tests de la galerie. Ne pas remettre le couvercle d'incubation après l'ajout du réactif (Murray *et al.*,2003).

- Interprétation :

L'identification a été réalisée à l'aide d'un logiciel d'identification (feuille Excel pour l'identification microbienne).



**Fig.11** : Galerie API 20E

### **3.6.6 Teste oxydase**

#### **3.6.6.1 Principe**

L'oxydase est une enzyme qui catalyse une réaction d'oxydoréduction impliquant une molécule de dioxygène (O<sub>2</sub>) comme accepteur d'électrons (**Denis *et al.*, 2007**).

La mise en évidence de l'oxydase a été faite selon la méthode des disques d'oxydase qui consiste à : Déposer sur une lame un disque d'oxydase, et l'imbiber avec une goutte d'eau physiologique stérile ;

Prélever une colonie à l'aide d'une pipette Pasteur et l'étaler sur le disque.

#### **3.6.6.2 Lecture**

La présence d'une cytochrome-oxydase se traduit, en 20 à 60 secondes, par l'apparition d'une coloration rouge virant rapidement au violet très foncé. Si la colonie reste incolore, le germe ne possède pas d'oxydase, le test est négatif.

### **3.7 Méthodes de bio contrôle**

#### **3.7.1 Bio contrôle à base des extraits naturels**

Le but de cette étude est de mettre en évidence l'activité antifongique de quelque extraits naturels ; il s'agit de :

##### **3.7.1.1 Macérat de l'ail**

Nous prenons trois boîtes de pétri divisé chaque boîte en deux, dans :

La première boîte : nous mettons juste la gélose Sabouraud (témoin), et après on fait l'ensemencement du champignon.

La deuxième boîte : nous mettons 7 gouttes séparés de solution de l'ail (macération aqueuse à froid) puis nous mettons la gélose Sabouraud, et nous faisons des mouvements en 8.

La troisième boîte : nous mettons 5 gouttes d'extrait de l'ail (macération huileuse à chaud) puis sur ces gouttes nous mettons aussi des gouttes de Tween 20 et à la fin on met la gélose Sabouraud, et nous faisons des mouvements en 8.

À l'aide d'une pipette stérilisée sur ses trois différentes boîtes divisées en deux : dans la première partie nous faisons des stries et dans la deuxième partie nous ensemencant un cylindre de gélose contenant le phytopathogène ;

Nous mettons les boîtes recouvertes du papier aluminium en incubation à température ambiante.

### 3.7.1.2 L'huile essentielle du romarin

Nous avons utilisé 3 boîtes pour 3 organes, dans chaque boîte de pétri vide et à l'aide de la pipette pasteur nous mettons 7 gouttes d'huile essentielle du romarin commercialisée nous versons dessus la gélose PDA en surfusion après nous ensemençons par stries le phytopathogène de chaque organe. Incubée les trois boîtes à température ambiante et à l'obscurité pendant trois (3) jours.



Fig.12 : L'huile essentielle du romarin

### 3.7.1.3 Le purin d'ortie

Par ce que l'extrait est plus concentré avant l'utilisation nous faisons une deuxième dilution (dans notre cas dans la boîte de pétri elle-même) avant de couler le milieu PDA ; 5 gouttes de l'extrait de purin d'ortie avec 5 gouttes d'eau distillée ;

Nous prenons quatre boîtes de pétri, nous coulons la gélose PDA dans chaque boîte une seule boîte divisée en trois comme témoin contenant les trois phytopathogène différent et les trois autres boîtes sont ensemencer par les phytopathogène de chaque organe ;

Nous mettons les boîtes recouvertes du papier aluminium en incubation à température ambiante.

## 3.7.2 Bio contrôle à base de micro-organismes

Le test de l'activité antifongique *in vitro* des isolats purifiés consistent à rechercher leur effet antagoniste sur le développement des phytopathogènes selon deux modes ;

### 3.7.2.1 Antagonisme en confrontation directe

Cette technique consiste à placer, dans la même boîte de Pétri contenant la gélose appropriée, deux pastilles gélosées (6 mm de diamètre), l'une portant l'antagoniste et l'autre le phytopathogène. Les deux pastilles sont placées suivant un axe diamétral à 3 cm et à équidistance du centre de la boîte (fig.13) ; les repiquages sont effectués en même temps. L'incubation est réalisée à 28°C pendant six jours (Hibar *et al.*,2005).

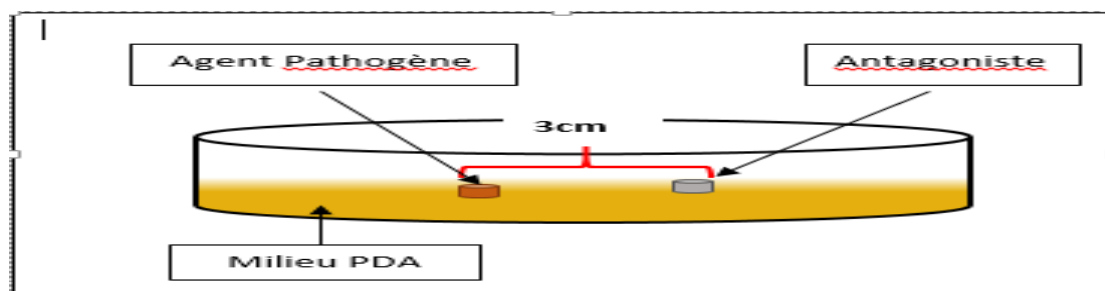
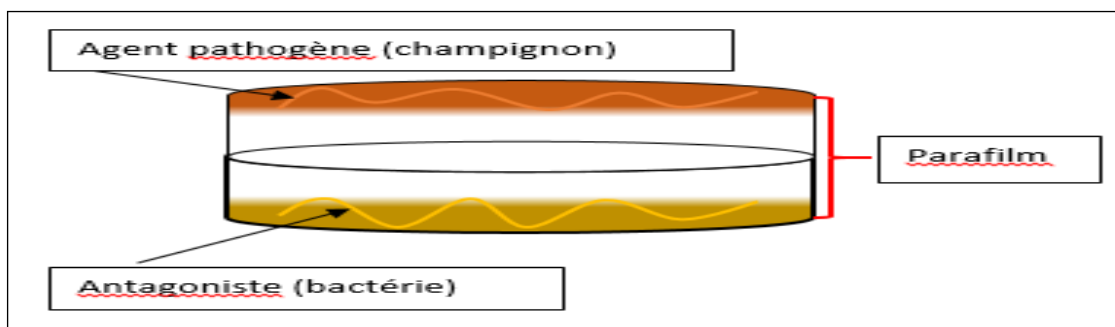


Fig.13 : Méthode de Confrontation directe (Hibar *et al.*,2005).

### 3.7.2.2 Antagonisme par confrontation indirecte

Cette méthode consiste à repiquer l'antagoniste et le pathogène dans deux boîtes séparées ; par la suite, un assemblage est réalisé par superposition des deux boîtes, l'antagoniste en bas et le phytopathogène en haut (fig.14). La jonction entre les deux boîtes est assurée par des couches de Parafilm afin d'éviter toute déperdition des substances volatiles (**Daami-Remadi, El Mahjoub, 2001**). Les conditions de culture sont identiques à celles de la confrontation par contact direct sur milieu de culture.



**Fig.14** : Méthode de confrontation indirecte (**Hibar et al.,2005**).

## 3.8 Test de biosurfactant

### 3.8.1 Production du biosurfactant

#### 3.8.1.1 Préparation du milieu de la fermentation en batch

Stérilisez 4 erlenmeyer vide fermés par aluminium dans l'étuve à 180°C pendant une 1h 30 min.

Remplir les erlenmeyers stériles refroidie avec 100 ml d'eau minérale.

Les quatre (4) erlenmeyers stériles sont répartis en 2 groupes chaque erlenmeyer contiennent une source de carbone différents ; huile et glycérol avec un inoculum jeune différent soit bactérie 2S, bactérie 4S.

Laisser en incubation pendant trois (3) jours.



**Fig.15** : Les erlenmeyers préparés.

### 3.8.2 Récupération de biosurfactant

Cette étape a été réalisée selon deux modalités, la première par centrifugation et la deuxième par extraction liquide-liquide (Grady *et al.*, 2019) ;

#### 3.8.2.1 La centrifugation

- Après incubation, nous agitions chaque erlenmeyer puis nous versons 4 ml du milieu de fermentation dans un tube à hémolyse (tubes à bouchon mauve pour huile d'olive et tubes à bouchon bleu et rouge pour glycérol) ;
- Nous plaçons les tubes à hémolyses dans des tubes coniques que nous mettons dans la centrifugeuse à 7500 tours pendant 15 minutes ;
- Nous récupérons alors les surnageant qui contiennent les biosurfactants.

#### 3.8.2.2 Extraction liquide-liquide

- Ajouter l'acétate d'éthyle au milieu de fermentation contenu dans les erlenmeyers (1v :1v)
- transvaser le contenu de chaque erlenmeyer dans une ampoule à décantation
- laisser à l'obscurité tout une nuit pour faciliter la séparation de la phase organique et la phase aqueuse.



**Fig.16** : Extraction liquide-liquide

- Récupérer la phase liquide dans un erlenmeyer et la phase organique dans un bécher
- Placer le bécher dans l'étuve à 37°C laisser jusqu'à l'évaporation du solvant
- Récupérer le biosurfactant pure.

### 3.8.3 Test de l'activité antifongique des biosurfactants (méthode des puits)

- Nous utiliserons 6 boîtes de pétri chaque boîte divisée en quatre quarts ;
- Nous coulons toutes les boîtes avec le milieu PDA, laissons-les solidifier ;
- A l'aide d'une pipette Pasteur nous creusons des puits dans la gélose (4 puits par boîte de pétri) ;
- Nous ensemençons par stries chaque phytopathogène dans deux boîtes de pétri ;

- Au total huit puits pour chaque phytopathogène contiendront des biosurfactants de sources différentes ;
- Incubation à température ambiante.

### 3.9 La micro encapsulation

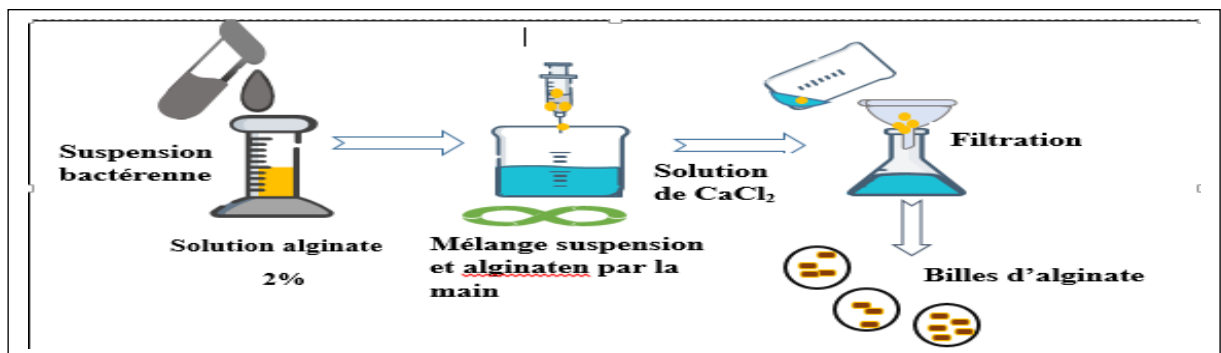
L'intérêt de la micro encapsulation c'est pour :

- La libération prolongée du produit ;
- La capacité de récupérer le produit (le recyclage des billes et leur réutilisation) ;
- Pour préserver le principal actif contre les facteurs abiotiques.

#### 3.9.1 Synthèse des microbilles d'alginate

L'alginate de sodium est un polysaccharide largement utilisé dans des différents secteurs grâce à leurs propriétés physicochimiques.

Les billes d'alginate contenant les cellules bactériennes (antagonistes) et leurs biosurfactants ont été préparées selon la méthode (Fig.17). 45 ml d'alginate de sodium 2% ont été préparés et stérilisés dans l'autoclave (121°C pendant 15 min). L'alginate stérile a été mélangé avec 5 ml de la suspension cellulaire de 24 h déjà préparée et homogénéiser aseptiquement. Le mélange a été introduit dans une seringue stérile (2,5 ml), La pression manuelle exercée sur le piston de la seringue permettait de faire tomber le contenu de la seringue goutte à goutte dans une solution de coagulation de  $\text{CaCl}_2$  a 0,05 M préalablement autoclavée et refroidie. Les billes formées ont ensuite été laissées pendant une heure sous agitation douce pour compléter l'ionisation échanger  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ . Après, les billes ont été retirées de la phase aqueuse et lavées deux fois avec de l'eau distillée stérile pour éliminer le chlorure de calcium non lié de la surface des billes. Enfin les billes (l'encapsulat) ont été filtrées puis conservées dans un sérum physiologique stérile à 4°C pour une utilisation ultérieure *in situ*.



**Fig.17** : Méthode d'encapsulation de la souche dans l' alginate de sodium (BOUROUJNA *et al.*,2022) (modifiée)

### 3.10 Test d'antagonisme *in situ*

Après la sélection des souches bactériennes antagoniste et la mise en évidence de leur effet inhibiteur sur le développement des champignons phytopathogènes (Test *in vitro* et Test des biosurfactants) et après leur encapsulation dans les billes d'alginate, nous obtenons quatre solutions différentes que nous allons tester *in situ*.

Le traitement illustré dans (fig.25) a été appliqué sur les quatre arbres de grenadier infectés en arrosant directement les bases des troncs d'arbres chacun par une solution.



**Fig.18 :** Traitement *in situ* des quatre arbres infectés.

# **Chapitre 03 :**


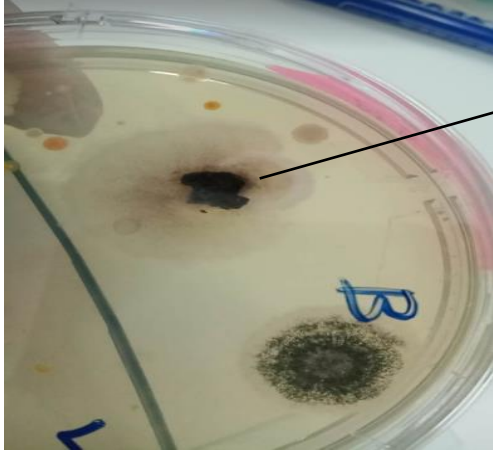

## **Résultats et discussion**

## 1 Résultats

### 1.1 Le résultat de l'identification des phytopathogènes du grenadier

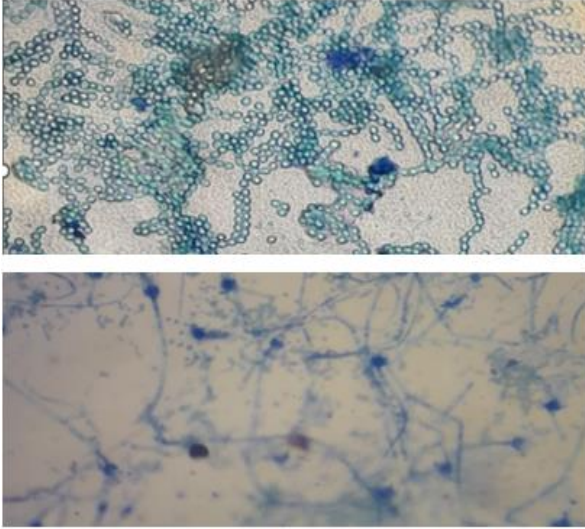
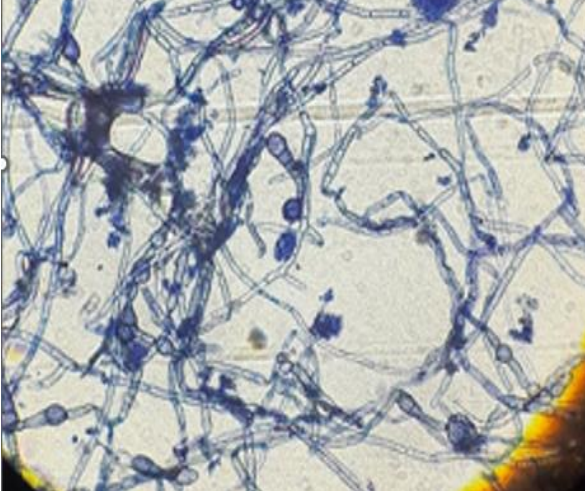
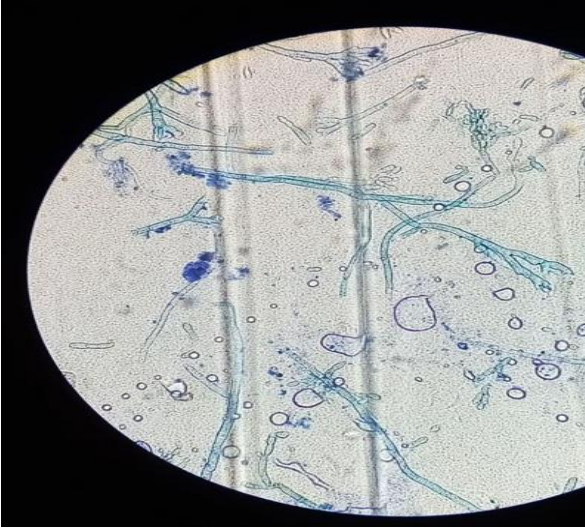
Les résultats de l'observation macroscopique sont récapitulés dans le tableau suivant :

**Tab.03** : Observations macroscopique des champignons phytopathogènes.

Organe	Aspect macroscopique	Description
Fruit		<ul style="list-style-type: none"> <li>-colonie moyenne de couleur verte à bleuâtre, à bordure blanche.</li> <li>-aspect poudreux.</li> </ul>
Tronc		<ul style="list-style-type: none"> <li>-Croissance rapide sur le milieu de culture.</li> <li>-Couleur verdâtre au départ qui devient rapidement plus foncée.</li> <li>-texture duveteuse.</li> </ul>
Branche		<ul style="list-style-type: none"> <li>-grosse colonie de couleur grise.</li> <li>-texture cotonneuse.</li> </ul>

Les résultats de l'observation microscopique sont récapitulés dans le tableau suivant :

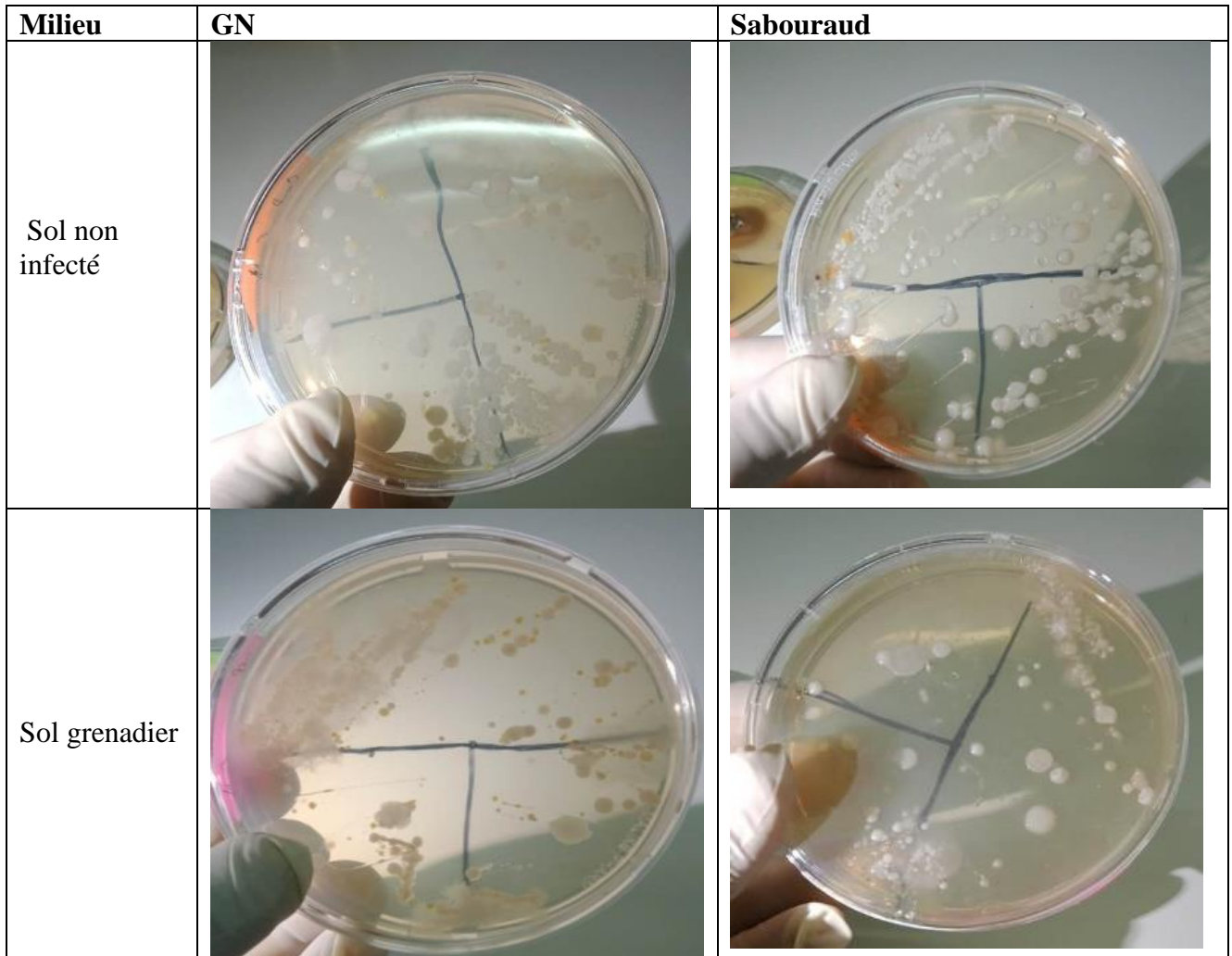
**Tab.04** : Observations microscopique des champignons phytopathogènes.

Organe	Observation microscopique	Description
Fruit		<p>-L'espèce <i>Aspergillus</i> se caractérise par une tête aspergillaire.</p> <p>-avec une vésicule sphérique à légèrement allongée</p> <p>-les chaînes de conidies en colonnes, petite de forme sphérique à subsphérique.</p>
Tronc		<p>-Des hyphes septés</p> <p>-Conidiophores qui sont marron, d'aspect ovoïde avec une partie basale arrondie.</p> <p>-Les conidies présentent des cloisonnements transversaux et longitudinaux et sont caractéristiques de genre <i>Alternaria</i>.</p>
Branche		<p>-les conides sont de taille moyenne avec une forme cylindrique et des extrémités obtuses.</p> <p>-Les appressoria étaient ovales.</p>

**1.2 Résultat de l'identification des bactéries antagonistes**

Les résultats de l'observation macroscopique sont récapitulés dans le tableau suivant :

**Tab.05** : observation macroscopique des boîtes du sol ensemencé.





**Tab.06** : description macroscopique des colonies des boîtes du sol.

Colonie	Taille	Opacité	Couleur	Contour	Élévation
1	Moyenne	Opaque	Orange	Irrégulier	Plate
2	Moyenne	Opaque	Crémer	Régulier	Plate
3	Moyenne	Opaque	Blanche	Régulier	Bombée
4	Moyenne	Opaque	Blanche	Irrégulier	Bombée
5	Moyenne	Opaque	Blanche	Irrégulier	Plate
6	Moyenne	Opaque	Jaune	Irrégulier	Plate
7	Moyenne	Opaque	Blanche	Irrégulier	Plate

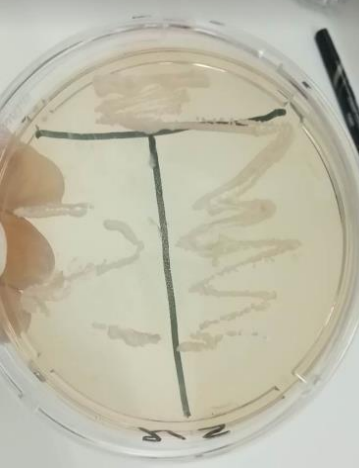
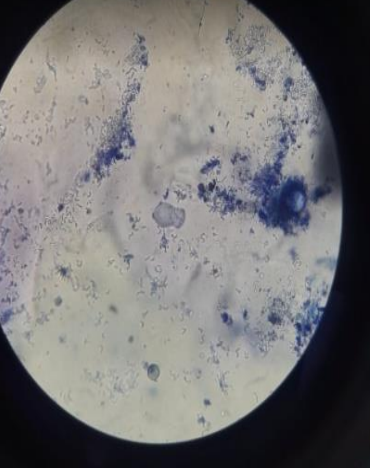
Les résultats du repiquage sont récapitulés dans le tableau suivant :

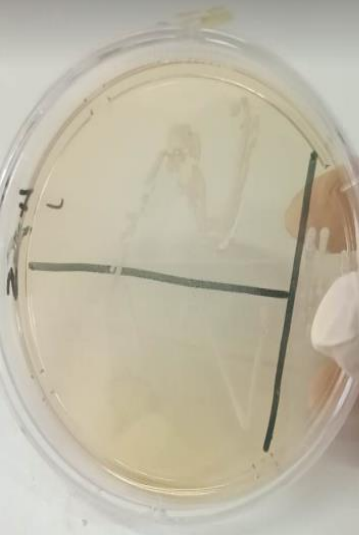

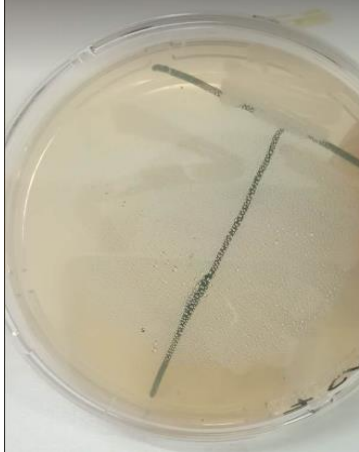

**Tab.07** : résultat de Repiquage et purification des colonies de bactéries.

<p>Sabouraud Boîtes : 1-2-3-4- 5.</p>	
<p>GN Boîtes : 6-7.</p>	

A partir du résultat nous avons choisi 3 bactéries pure 2S, 4S, 7GN pour continuer notre étude. Les résultats de l'observation macro et microscopique des souches bactériennes sont récapitulées dans le tableau suivant :

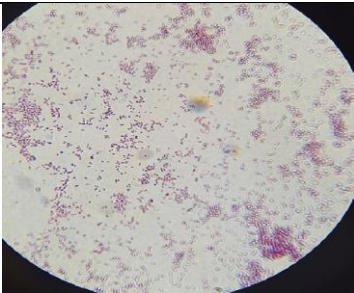
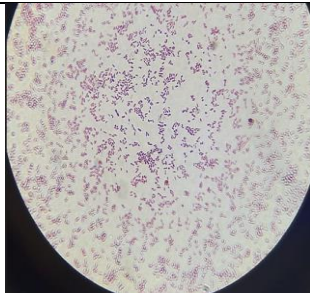
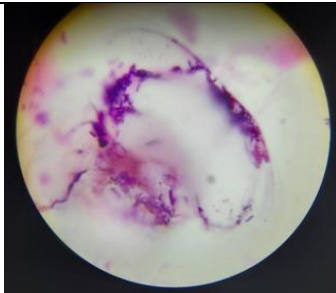
**Tab.08** : Résultats d'observation macroscopique et microscopique des trois souches.

Boîtes	Aspect macroscopique	Aspect microscopique	Description
2			<ul style="list-style-type: none"> <li>-Bacille</li> <li>-En chaînette/ diplobacille</li> <li>-mobile.</li> </ul>

4			<p>-Bacille -Bâtonnets en chaînette /isolé/diplobacille/non sporule. -Immobile.</p>
7			<p>-Bacille -Isolé/sporulé/bâtonnets en palissade. -mobile.</p>

Les résultats de la coloration du Gram des souches bactérienne sont récapitulés dans le tableau suivant :

**Tab.09** : Résultat de la coloration de Gram.

Souches	2S	4S	7GN
Après la coloration du Gram	 <p>Couleur violet : Gram+, <i>Bacillus</i>.</p>	 <p>Couleur rose : Gram-, bactérie il nécessite la galerie API pour identifier.</p>	 <p>Couleur violet : Gram+, <i>Bacillus</i>.</p>

Nous supposons que la bactéries 4S peut être *Pseudomonas* pour la confirmation nous avons ensemencé cette bactérie dans deux milieux de culture :

Sur King B, le résultat est négatif donc il faut supprimer cette prédiction

Sur Hektoen (fig.19), la boîte a été contaminée.



**Fig.19** : Résultat de S4 sur milieu Hektoen.

**Identification par la galerie API 20E**



**Fig.20** : Résultat de la galerie API 20E après 24 heures.



**Fig.21** : Résultat de la galerie API 20E après 48 heures.

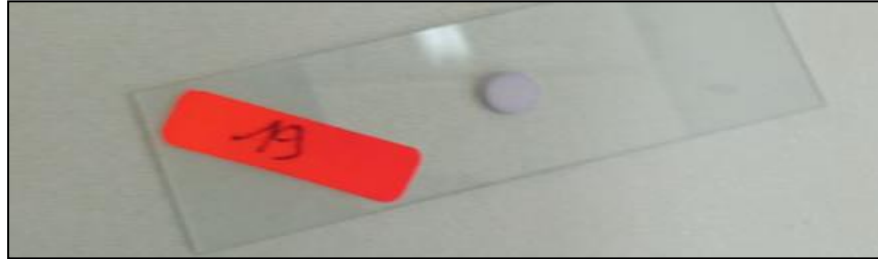


**Fig.22** : Résultat de la galerie API 20E après l’addition des réactifs.

A partir du logiciel d’identification (API web ; feuille Excel pour l’identification microbienne) il s’avère que la souche 4S correspond à l’espèce *Serratia odorifera*.

**Test d'oxydase**

Si les bactéries oxydent le disque, le disque deviendra violet à l'endroit où la colonie a été déposée soit immédiatement, soit quelques secondes après, indiquant un test positif. Aucun changement de couleur, indique un test négatif. Les résultats obtenus sont présentés dans la (fig.23).



**Fig.23** : Observation du résultat négatif de test d'oxydase de la souche 4S.


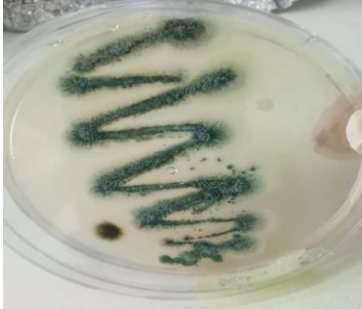

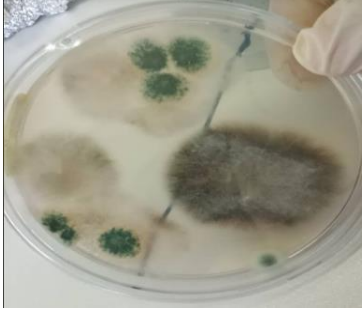
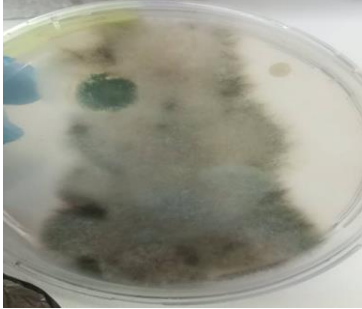
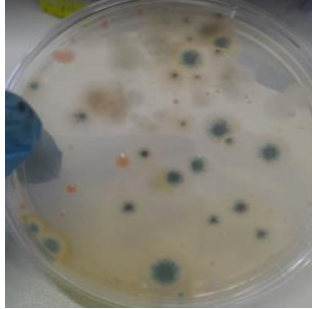

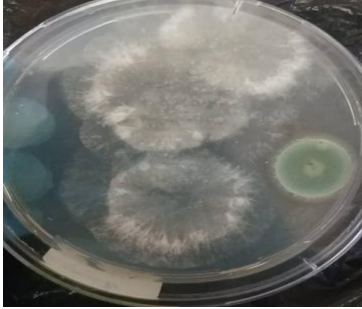
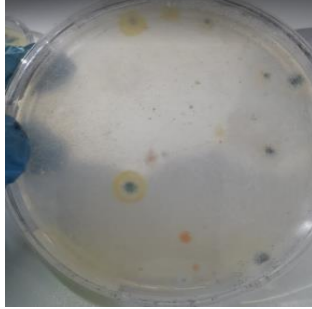
**1.3 Résultat du Bio contrôle à base d'extraits naturels**

Les résultats des observations macro et microscopiques sont récapitulés dans le tableau suivant :

**Tab.10** : Résultat de l'activité antifongique des macérât de l'ail.

	Témoin	Macérât aqueuse	Macérât huileuse
Macroscopique			
Microscopique			



**Tab.11** : Résultat de l'activité antifongique de l'huile essentielle de Romarin et purin d'ortie.

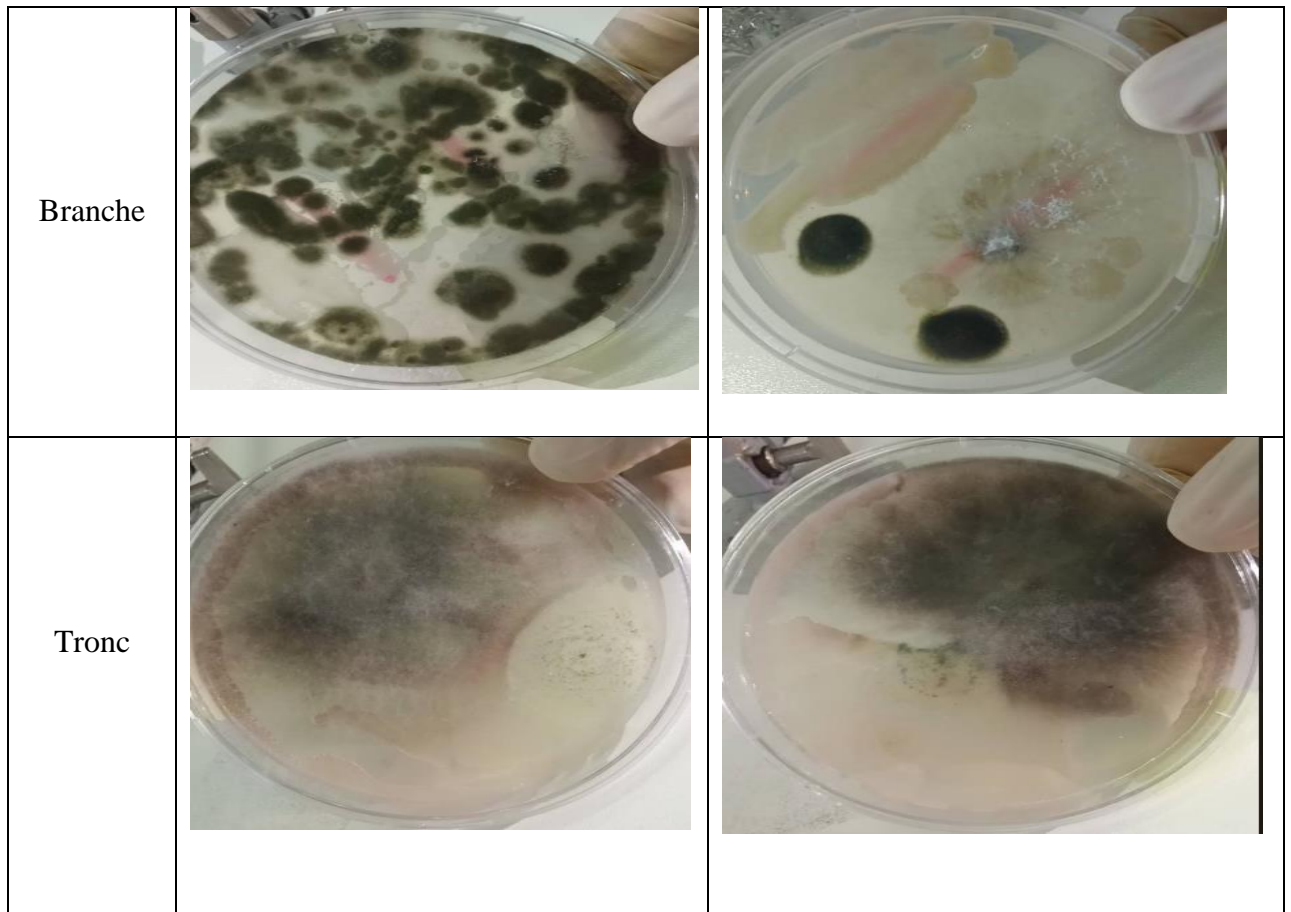
	Témoin	Huile essentielle de Romarin	Purin d'ortie
Fruit			
Tronc			
Branche			

#### 1.4 Résultat du Bio contrôle à base des microorganismes

Les résultats de la confrontation directe sont récapitulés dans le tableau suivant :

**Tab.12** : Résultat de la confrontation directe.

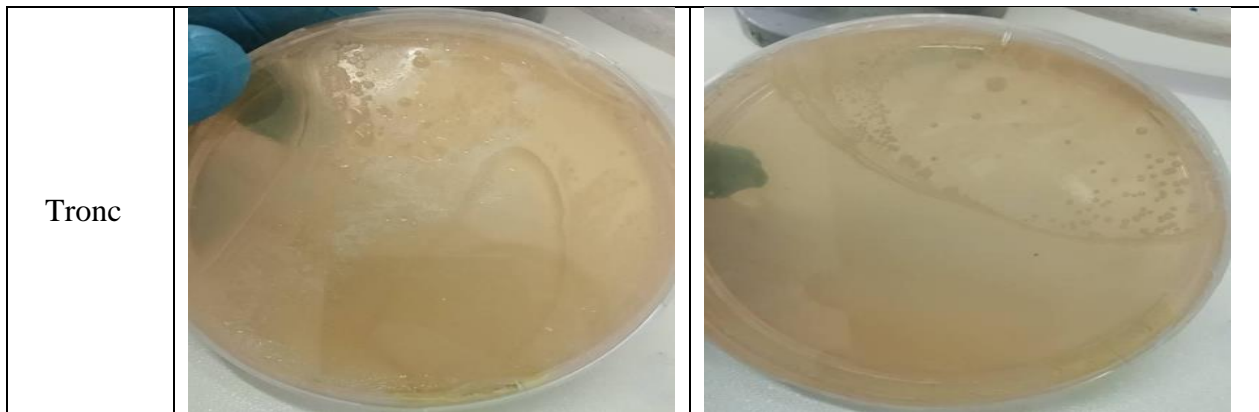
Organe	S2	S4
Fruit		



Les résultats de la confrontation indirecte sont récapitulés dans le tableau suivant :

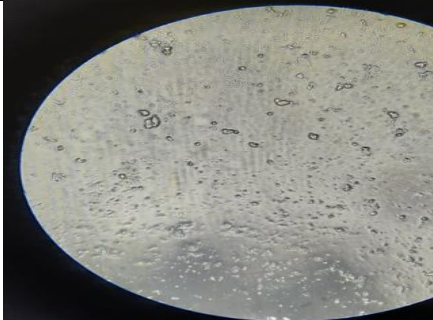
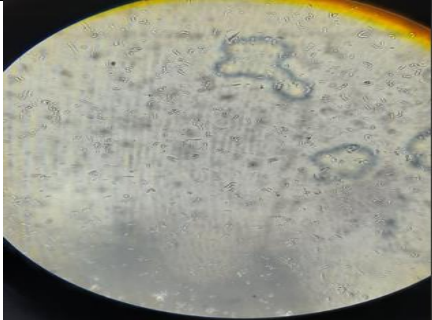
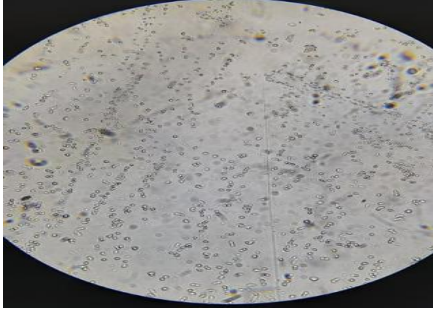
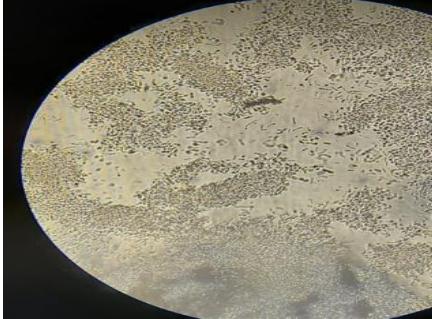
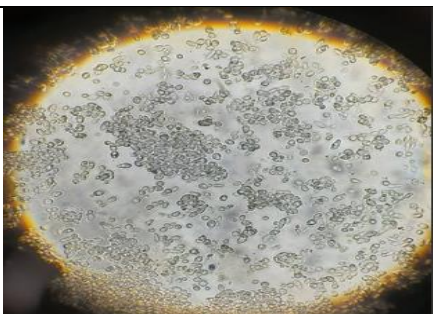

**Tab.13** : Résultat confrontation indirecte.

Organe	2S	4S
Fruit		
Branche		



Le résultat des observations microscopiques des boîtes de la confrontation indirecte sont récapitulés dans le tableau suivant :

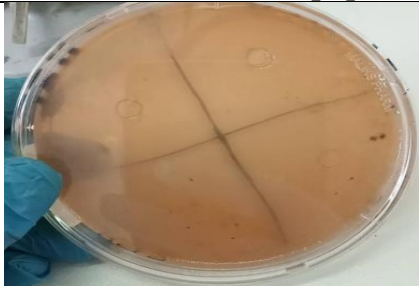
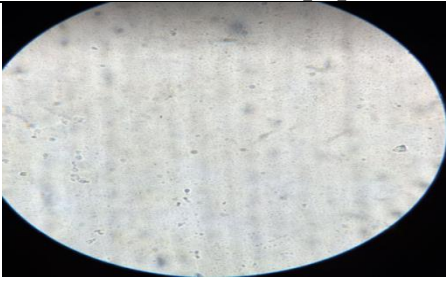
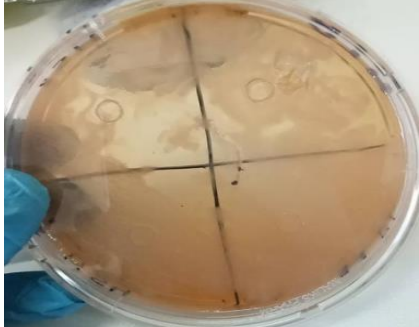
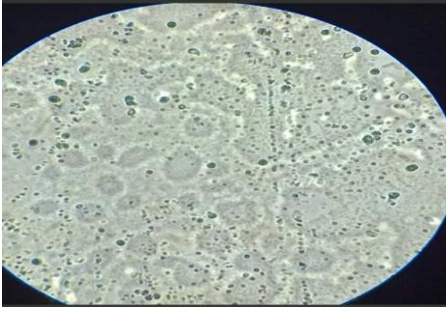
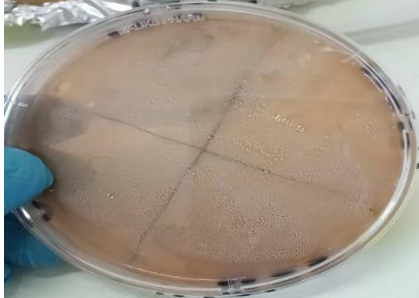
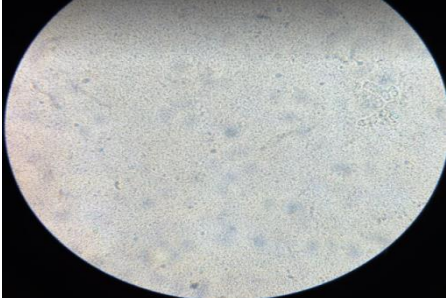
**Tab.14** : Observations microscopique des boîtes de confrontation indirecte.

	Boîtes	Champignon	Bactérie
<b>Fruit</b>	2S		
	4S		
<b>Tronc</b>	2S		

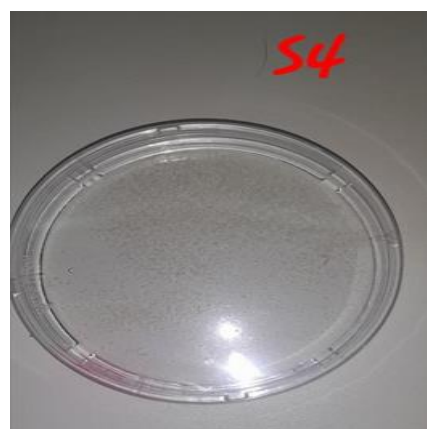
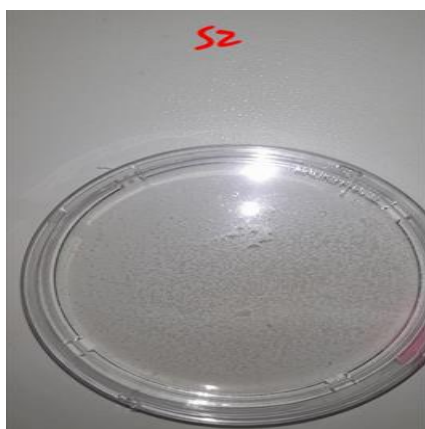


Les résultats de l'observation macro et microscopique des boîtes traitées par l'huile d'olive sont récapitulées dans le tableau suivant :

**Tab.16** : Observations macroscopique et microscopique des boîtes contient Source de carbone huile.

Organe	Observation macroscopique	Observation microscopique
<b>Fruit</b>		
<b>Tronc</b>		
<b>Branche</b>		

### 1.6 Résultats d'encapsulation des billes d'alginate



**Fig.24** : les billes d'alginate dans l'eau physiologique.



**Fig.25** : Flacons contenant les microbilles.

## 2 Discussion

L'utilisation d'extraits naturels (macérât de l'ail, l'huile essentielle du romarin et purin d'ortie) comme antifongique a un effet inhibiteur sur les agents phytopathogènes isolés *Aspergillus*, *Alternaria* et *Colletotrichum*, bien que cet effet ne soit pas très significatif. On observe néanmoins une légère croissance mycélienne.

L'utilisation de ces extraits a été évoqué par plusieurs auteurs ; tels que **Benkeblia, (2004)** les extraits d'ail ont montré une forte activité inhibitrice contre une série de bactéries pathogènes et champignons, d'autres études ont démontré le potentiel du Romarin pour lutter contre des pathogènes d'agrumes et le mildiou de la tomate (**Ojaghian et al., 2014**).

Selon **Gouffier (2010)**, cette action serait due à une substance de la famille des phytolectines que l'on trouve dans la racine de l'ortie en quantité très importante (de 0,5 à 3%). Cette substance agit en inhibant la croissance des champignons responsables de maladies cryptogamiques.

Ces résultats suggèrent que l'inhibition de la croissance fongique obtenue par l'utilisation de ces extraits est moins marquée que celle obtenue par la méthode de confrontation.

Le test d'antagonisme in vitro a permis d'estimer le potentiel inhibiteur des bactéries vis-à-vis des trois souches fongiques phytopathogènes isolées. Cette évaluation a révélé des intensités inhibitrices variables selon la souche antagoniste.

L'aspect macroscopique des boîtes donne une idée de l'effet inhibiteur de *Serratia sp.* et *Bacillus sp.* sur la croissance des trois champignons.

Les résultats montrent que même que les isolats phytopathogènes *Aspergillus*, *Alternaria* et *Colletotrichum* ont envahi complètement les boîtes d'expérimentation, tandis que les antagonistes *Bacillus* et *Serratia* n'occupent qu'une surface variable, mais *Serratia sp.* inhibe la croissance des isolats pathogènes mieux que *Bacillus sp.*, ce qui suggère une inhibition de la croissance mycélienne relativement faible. La souche de *Bacillus sp.* n'est pas montrée meilleure que la souche *Serratia sp.*

Selon **Siddiqui (2005)**, les *Pseudomonas fluorescens* et certaines espèces de *Bacillus* jouent un rôle actif dans la suppression des microorganismes phytopathogènes. Ces antagonistes bactériens renforcent la suppression des agents pathogènes des plantes par la sécrétion des métabolites extracellulaires, qui exercent un pouvoir inhibiteur à des faibles concentrations.

D'après les résultats obtenus, on constate que malgré l'absence d'un contact direct entre les champignons testés et les souches bactériennes, certaines de ces dernières ont pu exercer une activité inhibitrice sur le développement des colonies des champignons.

Ceci s'expliquerait par la capacité de ces antagonistes à produire des substances volatiles qui sont capables de limiter et même de stopper la croissance des champignons.

Le test de l'activité antagoniste des bactéries contre les agents pathogènes par contact indirecte met en évidence un effet inhibiteur en l'absence des champignons pathogènes, où seules les bactéries sont présentes.

Les tests indirects ont révélé que toutes les souches testées présentent un effet antagoniste contre les trois champignons phytopathogènes isolés *Aspergillus sp.*, *Alternaria sp.* et *Colletotrichum sp.*

**Moore-Landecker et Stotzky (1972)** ont montré que certaines bactéries produisent des substances antibiotiques volatiles qui inhibent fortement la croissance et la sporulation de plusieurs champignons phytopathogènes.

Ces résultats rejoignent ceux de **Zheng et al. (2013)**, signalant que les composés volatiles antifongiques, 2-nonanone,  $\beta$ -benzeneethanamine et 2-decanone produits par les souches *Bacillus pumilus* et *Bacillus thuringiensis* inhibent complètement la croissance de *Colletotrichum gloeosporioides*.

**Chaves-Lopez et al. (2015)** ont signalé que les souches *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens* et *Bacillus cereus* sont les meilleurs producteurs des substances volatiles antifongiques.

Contrairement aux résultats de confrontation directe, les souches du genre *Bacillus* exercent un effet inhibiteur plus important sur la croissance des trois souches fongiques. Dans le même ordre d'idées **Hmouni et al. (1999)** avait rapporté que certaines bactéries sont plus actives via la libération des substances volatiles que diffusible et vice versa.

Les résultats de l'activité antifongique des biosurfactants excrétés par les deux antagonistes isolés *Serratia* et *Bacillus*, ont montrés un antagonisme positif via la méthode des puits qui concerne juste la source de carbone de l'huile d'olive comparé au glycérol ; une croissance mycélienne a été observée dans les boîtes contenant du glycérol comme source de carbone, tandis qu'aucune croissance n'est constatée dans les boîtes contenant de l'huile comme source de carbone. Cette observation suggère que la nature du biosurfactant excrété diffère avec la source du carbone.

Le choix de la source de carbone additionnée dans le milieu de fermentation n'est pas aléatoire, il se base sur plusieurs lectures faites de recherches effectuées par d'autres chercheurs.

Des rendements importants en biosurfactants et forte stabilité des émulsions étaient obtenus dans les travaux de **Sifour et ses collaborateurs (2007)** sur *Pseudomonas aeruginosa* lorsque la source de carbone utilisée était l'huile végétale et pas l'hydrocarbure.

**Varadharajan et Subramaniyan (2013)** ont comparé l'utilisation de plusieurs déchets agroalimentaires et huiles comme source de carbone pour la production. L'huile végétale est considérée selon eux, parmi les sources qui donnent les meilleurs rendements en biosurfactants.

Les biosurfactants peuvent être utilisés pour éliminer les agents pathogènes des plantes et pour augmenter la biodisponibilité des nutriments pour les microbes associés aux plantes bénéfiques. Jouant le rôle d'antagonistes empêchant la propagation des zoospores dans les systèmes de culture sans sol (l'hydroponique) (**Hultberg *et al.*, 2008**).

Selon **Giraud (2002)**, la micro encapsulation confère à l'actif encapsulé des propriétés qu'il ne possède pas lorsqu'il est libre et facilite son utilisation. Le premier avantage réside dans la protection et/ou l'augmentation de la stabilité d'actifs sensibles à des agressions du milieu extérieur (oxydation, pH, humidité) et le deuxième consiste en la libération contrôlée de l'actif.

Les résultats de l'approche de la micro-encapsulation et le traitement in situ doivent être communiqué dès leurs apparitions dans un futur proche pour pouvoir confirmer l'efficacité du bio contrôle.

# **Conclusion**

## Conclusion

Cette étude a porté sur l'isolement et l'identification de souches fongiques phytopathogènes à partir d'un arbre de grenadier (*punica granatum L.*) infecté, ainsi que sur l'isolement de souches antagonistes à partir du sol sain du jardin botanique de l'université 20 Aout 1955 Skikda.

L'identification des espèces pathogènes et antagonistes a été réalisée en utilisant des caractères morphologiques macroscopiques et microscopiques.

Les résultats de l'examen macroscopique et microscopique ont révélé la présence des espèces phytopathogènes *Alternaria*, *Aspergillus* et *Colletotrichum*. Les souches antagonistes identifiées appartiennent aux genres *Serratia* et *Bacillus*.

Des tests utilisant des extraits naturels tels que des macérats d'ail, de l'huile essentielle de romarin et du purin d'ortie ont été réalisés, mais son efficacité est moindre comparée à ceux des confrontations.

Lorsqu'il y avait un contact direct entre les agents antagonistes du sol (*Serratia* et *Bacillus*) et les pathogènes (*Alternaria*, *Aspergillus* et *Colletotrichum*), une croissance mycélienne des champignons a été observée sous l'effet des substances antifongiques excrétées par les antagonistes.

En revanche, dans la confrontation indirecte, les bactéries ont montré un effet inhibiteur sur la croissance des champignons en libérant des composés organiques volatils antifongiques.

Un test de biosurfactant à base des bactéries *Serratia* et *Bacillus* a été réalisé en utilisant l'encapsulation des billes d'alginate, et il a été utilisé comme traitement *in situ*.

Ce modeste travail nécessite d'autres investigations pour approfondir l'étude :

- Approche moléculaire pour mieux identifier les deux antagonistes et les trois phytopathogènes.
- Et la caractérisation des composés organiques volatile responsables de l'activité antifongique mise en évidence par la confrontation indirecte.

Pour les prochaines étapes, il est prévu de confirmer l'efficacité du traitement *in situ*.

## **Références bibliographiques**

## Références bibliographiques

- Agrios G.N. (2005).** Plant pathology. 5 th ed. Elsevier Academic Press.USA.
- Anderson JM., Aitken EAB., Dann EK. (2013).** Morphological and molecular diversity of *Colletotrichum* spp. causing pepper spot and anthracnose of lychee (*Litchi chinensis*) in Australia. *Plant Pathology*,62 : 279–288.
- Aouar L. (2012).** Isolement et identification des actinomycètes antagonistes des microorganismes phytopathogènes. Thèse de doctorat. Université Mentouri. Constantine. Algérie.
- Ayesha, K., Ikram, U.H., Waseem, A.B., et Sikander, A., (2003).** Isolation and screening of *Aspergillus niger* isolates for xylanase biosynthesis. *Biotechnology*, 185- 190 p.
- Bailey JA., Jeger MJ. (1992).** *Colletotrichum*. Biology, pathology, and control. CABI, Wallingford, UK.
- Barhoom S., Sharon A. (2004).** cAMP regulation of “pathogenic” and “saprophytic” fungal spore germination. *Fungal Genet Biol* ,41: 317-326.
- Benkeblia, N. (2004).** Antimicrobial activity of essential oil extracts of various onions (*Allium cepa*) and garlic (*Allium sativum*). *LWT-food science and technology* 37, 263-268.
- Bernstein B., Zehr EI., Dean RA. (1995).** Characteristics of *Colletotrichum* from peach, apple, pecan and other hosts. *Plant Disease*, 79 : 478–482.
- Botton B. Breton, A., Fevre, M., Gauthir S., Guy P.H. Larpent J.P. Reymond P. Sanglier J.J., Vayssier Y, Veau P. (1990).** Moisissures utiles et nuisible importance industrielle.2ème édition. Masson collection biotechnologies. p.34-42.
- Bougeois, A.C., & Leveau, J.Y. (2006).** Le *Bacillus cereus*, caractéristiques générales et pathogénicité. *Archives de Pédiatrie*, 13(11), 1451-1455.
- Bourdon J.L et Marchal N. (1981).** Technique bactériologique. DOIN.335p.
- Bouroujna, A.; Ghebache, M.; Merzouk, R. (2022).** Evaluation de l’effet de l’encapsulation sur la survie d’une bactérie lactique dans les conditions gastrointestinales. Master Microbiologie Appliquée. Université Sadik ben Yahia Jijel.
- Carbounelle D., Kouyoumdjian S., Audurier A., (1988).** Bactériologie médicale techniques usuelles. Méd. Mal. Inf. France. 251 p.
- Chabasse D., Bouchara J.P., Gentile L., Brun S., Cimon B., et Penn P. (2002).** Cahier de formation Biologie médicale, Les moisissures d’intérêt médical. Bioforma , France. 160p.
- Chaves- Lopez C., Serio A., Gianotti A., Sacchetti G., Ndagijimana M., Ciccarone C., Crouch JA., Beirn LA., Cortese LM. (2009).** Anthracnose disease of switchgrass caused by the novel fungal species *Colletotrichum navitas*. *Mycological*,113: 1411–1421.

- Crous PW., Groenewald JZ., Slippers B. (2016).** Global food and fibre security threatened by current inefficiencies in fungal identification. *Philosophical Transactions of the Royal Society, Biological Sciences*, 371: 1709.
- Daami- Remadi M. and El Mahjoub M., (2001).** Lutte biologique contre la pourriture aqueuse des tubercules de pomme de terre par *richoderma harzianum*. *Ann. L'INRAT* 74, p. 167–186.
- Damm U., Cannon PF., Woudenberg JH. (2012a).** The *Colletotrichum acutatum* species complex. *Studies in Mycology*, 73: 37–113.
- Damm U., Cannon PF., Woudenberg JH. (2012b).** The *Colletotrichum boninense* species complex. *Studies in Mycology*, 73: 1–36.
- Das P, Mukherjee S, Sen R. (2008).** Antimicrobial potential of a lipopeptide biosurfactant derived from a marine *Bacillus circulans*. *J Appl Microbiol* 104(6) :1675–1684.
- De Silva DD., Ades PK., Crous PW. (2017).** *Colletotrichum* species associated with chili anthracnose in Australia. *Plant Pathology*,66: 254–267.
- Dean R., Van Kan JAL., Pretorius ZA. (2012).** The top 10 fungal pathogen in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, 13 : 414–430.
- Denis F., Ploy M. C., Martine C., Bingen E., Quentin R. (2007).** *Bactériologie médicale : techniques usuelles*. Paris, Elsevier Masson SAS, 640p.
- Fadhil L, Kadim A, Mahdi A (2014).** Production of chitinase by *Serratia marcescens* from soil and its antifungal activity. *Journal of Natural Sciences Research* 4: 80-86.
- Farr DF., Rossman AY. (2017).** Fungal databases. *Systematic mycology and microbiology laboratory*, ARS, USDA. Retrieved February 26. February 2011.
- Freeman S., Shabi E. (1996).** Cross-infection of subtropical and temperate fruits by *Colletotrichum* species from various hosts. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 49 : 395–404.
- Geiser, D.M., Samson, R.A., Varga, J., Rokas, A., Witiak, S.M., (2008).** A review of molecular phylogenetics in *Aspergillus*, and prospects for a robust genus-wide phylogeny. *Aspergillus Genomic Era Wagening*. Wagening. Acad. Publ. 17–32.
- Giraud S., (2002),** Micro encapsulation d'un diisocyanate et d'un phosphate d'ammonium – Application , élaboration d'un système polyuréthane monocomposant à propriété retardatrice de flamme pour l'enduction textile, Thèse, Université Lille 1, p. 233.
- Giri AV, Anand Kumar N, Muthu Kumaran G, Pennathur G (2004).** A novel medium for the enhanced cell growth and production of prodigiosin from *Serratia marcescens* isolated from soil. *BMC Microbiol* 4 : 11.
- Gouffier G. (2010).** *L'ortie, culture et usages* Edition, Rustica. France, p50 -70.

- Grady, E. N.; MacDonald, J.; Ho, M. T.; Weselowski, B.; McDowell, T.; Solomon, O.; Renaud, J. and Yuan, Z. (2019).** Characterization and complete genome analysis of the surfactin producing, plant-protecting bacterium *Bacillus velezensis* 9D-6. BMC Microbiology. 19(1) :5-6. <https://doi.org/10.1186/s12866-018-1380-8>.
- Grimont F., Grimont P. A. D. (1992).** The genus *Serratia*. The Prokaryotes. 3: 2822– 2848.
- Guarnaccia V., Vitale A., Cirvilleri G., Aiello D., Susca A., Epifani F., Perrone G. and Polizzi G. (2016).** Characterization and pathogenicity of fungal species associated with branch cankers and stem-end rot of avocado in Italy. European Journal of Plant Pathology ,146: 963–976.
- Hamdache A., Azaker R., Lamarti A., Aleu J. and Collado LG. (2013)** Comparative genome analysis of *Bacillus* spp. and its relationship with bioactive non ribosomal peptide production. Phytochem Rev 12: 685-716.
- Hanson L. E., Howell C.R., (2002).** Biocontrol efficacy and other characteristics of proplaste fusants between *Trichoderma koningii* and *T. virens*. Mycological Research, 1063, 321-328.
- Hibar K., Daami-Remadi M., Khiareddine H., El Mahjoub M., (2004).** Effet inhibiteur in vitro et in vivo du *Trichoderma harzianum* sur *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicislycopersici*. Biotechnol. Agron. Soc. Environ. 2005 9 (3), 163–171.
- Hmouni A., Massaoui M et Douira A. M. (1999).** Etude de l'activité antagoniste de *Trichoderma* spp. et de *Gliocladium* spp. à l'égard de *Botrytis cinerea*, agent causal de la pourriture grise de la tomate. *El awamia*. 99: 76-92.
- Holt J G. (1994).** Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 9 Editions.
- Hultberg, M., Bodin, L., & Jansson, H. B. (2008).** Antagonistic activities among bacteria isolated from the rhizosphere of barley (*Hordeum vulgare*) grown on two different soils. Applied and Environmental Microbiology, 74(5), 1328-1334.
- Johansson, J., Paul, L and Finlay, R. (2004).** Microbial interactions in the mycorrhizosphere and their significance for sustainable agriculture. FEMS Microbial Ecol.,48 (1): 1-13.
- Kong, J. and Yu, S. (2007).** Fourier transform infrared spectroscopic analysis of protein secondary structures. Acta Biochim. Biophys. Sin. 39(8) :549-559.
- Kumar A, Saini P, Shrivastava JN. (2009).** Production of peptide antifungal antibiotic and biocontrol activity of *Bacillus subtilis*. Indian J Exp Biol 47(1):57–62.
- Leyral G et Joffin J.N. (2001).** Microbiologie technique. Tome 2. Document technique 2<sup>ème</sup> édition. CRDP De Bordeaux.

- Lima WG., Sposito MB., Amorim L., Goncalves F P. and Melo de Filo P A., (2011).** Colletotrichum gloeosporioides, a new causal agent of citrus post-bloom fruit drop. *European Journal of Plant Pathology*, 131: 157–165.
- Liangliang, L· Jiwen, W· Dehai, L· Lei, L· Jing, Z· Gao, L· Baitao, W· Wenling, Y., (2023).** The antagonistic potential of peanut endophytic bacteria against *Sclerotium rolfsii* causing stem rot, *Brazilian Journal of Microbiology*, 54 :361–370.
- Logrieco A., Moretti A., Solfrizzo M., (2009).** Alternaria toxins and plant diseases: an overview of origin, occurrence and risks. *World Mycotoxin Journal*, 2 (2), 129-140.
- Maughan, H., & Van der Auwera, G. (2011).** Bacillus taxonomy in the genomic era finds phenotypes to be essential though often misleading. In *Genetics and Evolution of Infectious Diseases*. Elsevier.pp. 65-81.
- Moore-Landecker E. and Stotzky G. (1972).** Inhibition of fungal growth and sporulation by volatile metabolites from bacteria. *Canadian Journal of Microbiology*. 18 : 957- 962.
- Morin O. (1994).** Aspergillus et aspergillose, biologie et techniques .Dans *Encycl.Med.Chir. Maladies infectieuses*.Elsevier, Paris.
- Muller H., Berg G. (2008).** Impact des procédures de formulation sur l'effet de l'agent de lutte biologique *Serratia plymuthica* HRO-C48 sur la flétrissure verceillienne du colza. *Biocontrôle*. 53 : 16-905.
- Murray P.R., Baron E.J., Jorgensen J.H., Pfaller M.A., Tenover F.C., Tenover R.H.(2003).** *Manual of Clinical Microbiology*. 8th Edition. American Society for Microbiology, Washington, D.C
- Ojaghian M.R., Chen Y., Chen S.,Cui Z Q., Xie G L. and Zhang J. (2014).** Antifungal and enzymatic evaluation of plant crude extracts derived from cinnamon and rosemary against *Sclerotinia carrot rot*. *Annals of Applied Biology*, 164:415-429.
- Pane, B., Sourabies, o., Philippe, A., Nikiem, A., Alfred, S. et Traor, E. (2011).** Caractérisation de Souches d'Aspergillus sp. isolées des graines d'arachides cultivées au Burkina Faso, Afrique de l'ouest. *International journal of biological and chemical Science*, 5(3):1232-1249.
- Perez, C., Pauli, M., & Bazerque, P. (1993).** An antibiotic assay by the agar well diffusion method. *Acta. Biol.Med.Exp.*,15:113-115.
- Perfect SE., Hughes HB., O'Connell RJ., Green J R. (1999).** Colletotrichum, a model genus for studies on pathology and fungal-plant interactions. *Fungal Genetics and Biology*, 27: 186–198.
- Pitt J I. (2002).** Toxigenic fungi and mycotoxins. *British Medical Bulletin*. 56(1): 184- 192.
- Pitt J.I.(1988).** *Laboratory guide to common Penicillium species*, Academia Press editor, London.
- Ponte J.J da. (1996).** *Clinica de doencas de plantas*. Fortaleza-CE : UFC., pp 871.

- Robert C. (2012).** Les maladies des plantes, identification, contrôle et gestion. Quae , Paris.
- Roger C. (1990)** Principe de phytopathologie et principe de lutte contre les maladies des plantes. Presses polytechniques et universitaire Romandes. 286P.
- Rouviere M.(2002).**Ochratoxine A, nature, origine et toxicité. Thèse de Doctorat. Sciences vétérinaires. Université Paul Sabatier. Toulouse.
- Sakhar, B. (2009).** Biological control of plant pathogens, current status and future prospects. In Crop Protection Challenges and Approaches, 119-148.
- Scheidegger K. A.et Payne G.A. (2003).** Unmoking the secrets behind secondary metabolism, A review of *Aspergillus flavus* from pathogenicity to functional genomics. *Journal of Toxicology and Toxin Review*,22,427-463.
- Sharma R, Singh J, Verma N. (2018).** Production, characterization and environmental applications of biosurfactants from *Bacillus amyloliquefaciens* and *Bacillus subtilis*. *Biocatal Agric Biotechnol* 16:132–139.
- Siddiqui I.A., Hass D et Heep S. (2005).** Extracellular protease of *Pseudomonas fluorescens* CHA0, a biocontrol factor with activity against the Root-Knot Nematode *Meloidogyne incognita*. *Applied and Environmental Microbiology*. 71 (9): 5646-5649.
- Sifour M, Majid H, Al-Jilawi, Ghazi M, Aziz, (2007).** Emulsification Properties of Biosurfactant Produced from *Pseudomonas aeruginosa* RB 28. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 10: 1331-1335.
- Simmons E G., (2007).** *Alternaria*. An Identification Manual: CBS Biodiversity Series No. 6. CBS Fungal Biodiversity Centre, Utrecht, the Netherlands, 775p.
- Slonczewski J., John F. (2009).** *Microbiology: An Evolving Science*. Norton & Company, Inc : 91, 488.
- Son, S.; Ko, S. K.; Jang, M.; Kim, J. W.; Kim, G. S. and Lee, J. K. (2016).** New cyclic lipopeptides of the iturin class produced by saltern-derived *Bacillus* sp. KCB14S006. *Mar Drugs*. 14(4) :72-73.
- Soufiane B. (1998).** Isolement à partir de la rhizosphère des conifères de bactéries et d'actinomycètes antagonistes aux champignons phytopathogènes. Maître ès science (M. Sc.). Univ. Laval, 69p.
- Spichiger RE, Savolainen VV, Figeat M, Jeanmonod D (2004).** *Botanique Systématique des Plantes à Fleurs*. Presses Polytechniques et Universitaires Romandes, Lausanne.
- Stellarini A., Corsetti A et Paparella A. (2015).** Diversity of food-borne *Bacillus* volatile compounds and influence on fungal growth. *Journal of Applied Microbiology*. 199: 487- 499.

**Zheng M., Shi J., Shi J., Wang Q et Li Y. (2013).** Antimicrobial effects of volatiles produced by two antagonistic *Bacillus* strains on the anthracnose pathogen in postharvest mangos. *Biology control*. 65 (2): 200-206.