



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة محمد البشير الإبراهيمي برج بوعريريج

Université Mohammed El Bachir El Ibrahimi B.B.A

كلية علوم الطبيعة والحياة وعلوم الأرض والكون

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et des Sciences de la Terre et de l'Univers

قسم العلوم البيولوجية

Département des Sciences Biologiques



Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme de Master

Domaine des Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Microbiologie appliquée

Intitulé :

**Pouvoir antimicrobien de quelques isolats de *Bacillus* sp.
isolés à partir de la rhizosphère d'une plante médicinale**

Présenté par:

BELMERABTA KHAOULA & BENHADJ HAKIMA

Soutenu le 12 / 06/ 2024, Devant le Jury :

	Nom & Prénom	Grade	Affiliation / institution
Président :	Mr. MERIBAI Abdelmalek	MCB	Université de Bordj Bou Arreridj
Encadrant :	Mr. SADRATI Nouari	MCA	Université de Bordj Bou Arreridj
Examinatrice :	M ^{me} . CHENOUF Nadia Safia	MCB	Université de Bordj Bou Arreridj

Année Universitaire 2023/2024

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

Remerciements

Avant toute chose, nous tenons à remercier Allah, Tout-Puissant et Miséricordieux, de nous avoir donné la santé, la force, le courage, la volonté et la patience nécessaires pour mener à bien ce travail.

En premier lieu, nous exprimons notre profonde gratitude à M. SADRATI Nouari, Maître de conférences de classe A à l'Université de BBA, pour son encadrement attentif et sa disponibilité malgré ses nombreuses responsabilités. Sa compétence, sa rigueur scientifique et sa clairvoyance ont été d'une aide précieuse tout au long de notre parcours. Il a été constamment présent durant toute la préparation et la finalisation de ce mémoire, demeurant un modèle exemplaire tout au long de notre formation.

Nous souhaitons également remercier sincèrement le docteur MERIBAI Abdelmalek, enseignant à l'Université de BBA, pour l'honneur qu'il nous a fait en présidant le jury de ce mémoire.

Nos vifs remerciements vont également au docteur CHENOUF Nadia Safia, enseignante à l'Université de BBA, pour avoir accepté d'examiner ce travail et de faire partie du jury.

Nous adressons nos remerciements au docteur ZERROUG Amina, enseignante à l'Université de BBA, pour son soutien, sa gentillesse, ses conseils, sa disponibilité et ses connaissances approfondies. Sa rigueur scientifique a été essentielle pour mener à bien cette étude.

Nos sincères remerciements vont également aux ingénieurs du laboratoire de microbiologie, Wahiba GAHFIF et MOUSSAOUI Sabrina, pour leur aide précieuse dans la réalisation pratique de ce travail.

Enfin, nous n'oublions pas de remercier tous ceux qui nous ont soutenus et encouragés tout au long de la réalisation de ce travail.

Merci à tous.

Dédicace

Je dédie ce modeste travail

A mon très cher père « LAID »

Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, le dévouement et du respect que j'ai toujours eu pour toi, rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être.

A ma très chère mère « SABIRA »

Affable, honorable, aimable, tu représentes pour moi le symbole de la bonté par excellence, la source de tendresse et l'exemple du dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi.

A mes chérs soeurs « Oumaima, Aicha, Yasmine, Hadil et la petite Malak »

Mes anges, je vous dédie ce travail avec tous mes vœux de bonheur, de santé et de réussite.

A mes vrais amies « Katia, kawther, zahra, sabrina, ismahane »

En souvenir des moments heureux passés ensemble, avec mes vœux sincères de réussite, bonheur, santé et de prospérité.

A mon très cher binôme Katia qui a partagé avec moi les moments heureux et difficiles de ce travail, je vous souhaite un avenir plein de joie, de bonheur et de réussite.

A ma famille, mes proches A tous ceux que j'aime.

A tous les enseignants et étudiants de ma promotion 2024.

Merci

Khaoula

Dédicace

Je remercie ALLAH le Généreux pour m'avoir guidé vers la lumière de la recherche du savoir et de la science.

Je dédie ce modeste travail à :

A ma très chère mère Hadda

Je ne trouve pas les mots pour exprimer tout ce que je ressens envers une mère exceptionnelle comme toi. Ta noblesse et ta bonté sont infinies. Tu as tout sacrifié pour mon bien-être, et je prie Dieu Tout-Puissant de préserver ton sourire, de te garantir une bonne santé et une longue vie afin que je puisse te combler d'amour.

A mon très cher père Rachid

J'ai toujours admiré ta grande personnalité et ta bonté. Tu es pour moi un exemple de réussite et de générosité. Que Dieu, le Tout-Puissant, te protège, te donne une meilleure santé et une longue vie pour que je puisse te rendre un peu de ce que je te dois.

A mes très chers frères et sœurs

Les mots ne suffisent pas pour exprimer l'amour que je vous porte. Je vous dédie ce travail Avec tous mes vœux de bonheur, de santé et de réussite.

A mes meilleurs amis Katia, Djana

La source de grand courage tout le moment de travail et toujours à côté de moi merci.

A mon très cher binôme khaoula qui a partagé avec moi les moments heureux et difficiles de ce travail, je vous souhaite un avenir plein de joie, de bonheur et de réussite.

A ma famille, mes proches A tous ceux que j'aime.

HAKIMA

الملخص

تهدف هذه الدراسة إلى تحليل عينات التربة الجذرية لنبات *Globularia alypum* في الجزائر لتقييم التأثير المضاد لبكتيريا *Bacillus sp.* ضد مختلف الفطريات الممرضة للنبات والبكتيريا الممرضة للإنسان. بعد تحديد الخصائص بالعين المجردة وتحت المجهر، تم تحديد الفطريات المعزولة على أنها *Alternaria alternata* و *Fusarium oxysporum* و *Ulocladium botrytis*. بعد ذلك، تم اختبار 48 عزلة من *Bacillus* على قدرتها المضادة. أظهرت العزلة B15 نشاطاً مضاداً للفطريات بشكل كبير ضد الفطريات الثلاثة، مع نسب تثبيط بلغت 65.51% و 49.43% و 50.71% على التوالي. أظهرت العزلات B1 و B47 و B18 و B47 و B18 نشاطاً مضاداً للبكتيريا بشكل ملحوظ ضد *Staphylococcus aureus*، *Micrococcus luteus*، *Escherichia coli*، مع مناطق تثبيط وصلت إلى 44.5 مم. أظهرت نتائج النشاط المضاد للميكروبات للمستخلصات، التي تم تقييمها بطريقة الآبار، أن ثلاث عزلات كانت نشطة ضد *Alternaria alternata* و *Ulocladium botrytis*، بينما كانت ثلاث عزلات أخرى نشطة فقط ضد *Alternaria alternata*. أظهرت العزلات B15 و B48 قدرة تثبيط أفضل ضد *Alternaria alternata* و *Ulocladium botrytis*، مع مناطق تثبيط بلغت 0.5 ± 34 ميليمتر و 2.25 ± 22.25 ميليمتر على التوالي. في المقابل، لم يتم ملاحظة أي نشاط ضد *Fusarium oxysporum*. كشفت التقييمات الإنزيمية عن تباين في مؤشرات الإنزيمات، باستثناء العزلة B33، التي لم تظهر أي نشاط لتحليل السليلوز أو البروتين. كانت أفضل العزلات المنتجة للإنزيمات البروتينية هي العزلات B23 و B15، مع مؤشرات إنزيمية بلغت 2.9 و 2.06 على التوالي. بالنسبة للنشاط السليلوزي، تم الحصول على أفضل المؤشرات من العزلات B18 و B12 و B48، بقيم بلغت 6.67 و 5.83 و 5.25 على التوالي. بالإضافة إلى ذلك، لم تكن أي عزلة قادرة على إنتاج الأميلاز. في الختام، أثبتت سلالات *Bacillus* فعاليتها في المختبر من خلال اختبارات التضاد وقدرتها على إنتاج الإنزيمات المحللة. وهذا يجعلها مصدرًا واعدًا في المجال الزراعي، مما يوفر حلاً محتملاً للمشاكل التي تسببها الفطريات الممرضة للنباتات.

كلمات مفتاحية: *Globularia alypum*، *Bacillus sp.*، فطريات مرضية نباتية، منافس، PGPR،

إنزيمات محللة.

Résumé

Cette étude a pour objectif d'analyser des échantillons de sol rhizosphérique de *Globularia alypum* en Algérie afin d'évaluer l'effet antagoniste de *Bacillus* sp. contre divers champignons phytopathogènes et bactéries pathogènes pour l'homme. Après l'identification macro et micro-morphologiques, les champignons isolés ont été identifiés comme étant *Alternaria alternata*, *Fusarium oxysporum* et *Ulocladium botrytis*. Les 48 isolats de *Bacillus* obtenus ont ensuite été testés pour leur pouvoir antagoniste. L'isolat B15 a montré une activité antifongique significative contre les trois champignons, avec des pourcentages d'inhibition respectifs de 65,51 %, 49,43 % et 50,71 %. Les isolats B1, B47 et B18 ont montré une activité antibactérienne notable contre *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus* et *Escherichia coli*, avec des zones d'inhibition atteignant jusqu'à 44,5 mm. Les résultats de l'activité antimicrobienne des filtrats, évalués par la méthode des puits, ont révélé que trois isolats étaient actifs contre *Alternaria alternata* et *Ulocladium botrytis*, tandis que trois autres isolats étaient actifs uniquement contre *Alternaria alternata*. Les isolats B15 et B48 ont montré une capacité d'inhibition meilleure contre *Alternaria alternata* et *Ulocladium botrytis*, avec des zones d'inhibition mesurant respectivement $34 \pm 0,5$ mm et $22,25 \pm 2,25$ mm. En revanche, aucune activité n'a été observée contre *Fusarium oxysporum*. L'évaluation enzymatique a révélé une variabilité des indices enzymatiques, à l'exception de l'isolat B33, qui n'a montré aucune activité cellulosique ni protéolytique. Les meilleurs producteurs d'enzymes protéolytiques étaient les isolats B23 et B15, avec des indices enzymatiques de 2,9 et 2,06 respectivement. Pour l'activité cellulosique, les meilleurs indices ont été obtenus par les isolats B18, B12 et B48, avec des valeurs de 6,67, 5,83 et 5,25 respectivement. De plus, aucun isolat n'a été capable de produire de l'amylase. En conclusion, les isolats de *Bacillus* ont montré leur efficacité in vitro à travers des tests d'antagonisme et leur capacité à produire des enzymes hydrolytiques. Cela en fait une source prometteuse pour le domaine agricole, offrant des solutions potentielles aux problèmes posés par les phytopathogènes.

Mots-clés : *Bacillus* sp., *Globularia alypum*, Champignons phytopathogènes, Antagoniste, PGPR, Enzymes hydrolytiques.

Abstract

This study aims to analyze rhizospheric soil samples of *Globularia alypum* in Algeria to evaluate the antagonistic effect of *Bacillus* sp. against various phytopathogenic fungi and human pathogenic bacteria. After macro and micro-morphological identification, the isolated fungi were identified as *Alternaria alternata*, *Fusarium oxysporum*, and *Ulocladium botrytis*. The 48 *Bacillus* isolates obtained were then tested for their antagonistic potential. Isolate B15 showed significant antifungal activity against the three fungi, with inhibition percentages of 65.51%, 49.43%, and 50.71%, respectively. Isolates B1, B47, and B18 demonstrated notable antibacterial activity against *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, and *Escherichia coli*, with inhibition zones reaching up to 44.5 mm. The results of the antimicrobial activity of the filtrates, evaluated by the well diffusion method, revealed that three isolates were active against *Alternaria alternata* and *Ulocladium botrytis*, while three other isolates were active only against *Alternaria alternata*. Isolates B15 and B48 showed better inhibition capacity against *Alternaria alternata* and *Ulocladium botrytis*, with inhibition zones measuring 34 ± 0.5 mm and 22.25 ± 2.25 mm, respectively. In contrast, no activity was observed against *Fusarium oxysporum*. The enzymatic evaluation revealed variability in enzymatic indices, except for isolate B33, which showed no cellulolytic or proteolytic activity. The best producers of proteolytic enzyme were isolates B23 and B15, with enzymatic indices of 2.9 and 2.06, respectively. For cellulolytic activity, the best indices were obtained by isolates B18, B12, and B48, with values of 6.67, 5.83, and 5.25, respectively. Additionally, no isolate was able to produce the amylase. In conclusion, the *Bacillus* isolates were demonstrated their efficacy in vitro through antagonism tests and their ability to produce hydrolytic enzymes. This makes them a promising source for the agricultural field, offering potential solutions to the problems posed by phytopathogens.

Keywords: *Bacillus* sp., *Globularia alypum*, Phytopathogenic fungi, Antagonist, PGPR, Hydrolytic enzymes.

Sommaire

Sommaire

Remerciements

Dédicace

الملخص.....	I
Résumé.....	II
Abstract.....	III
Sommaire.....	IV
Liste des tableaux.....	V
Liste des figures.....	VI
Liste des abréviations.....	VII
I.1 Introduction.....	1

Matériel et méthodes

II. Matériel et méthodes.....	8
II.1. Matériel.....	8
II.1.1. Matériel microbien.....	8
II.1.2 Matériel végétal.....	8
II.2 Milieux de culture.....	9
II.3 Site d'échantillonnage.....	9
II.4 Échantillonnage et prélèvement.....	10
II.5 Isolement de l'agent pathogène.....	10
II.6 Identification des isolats fongiques.....	13
II.6.1 Observation macroscopiques.....	13
II.6.2 Observation microscopique.....	13
II.7 Isolement du genre <i>Bacillus</i>	13
II.8 La purification des isolats.....	14
II.9 La conservation des isolats bactérienne.....	14
II.10 Dépistage de l'activité antagoniste contre les champignons phytopathogènes.....	14
II.11 Criblage de l'activité antibactérienne.....	15
II.12 Activité antimicrobienne.....	15
II.12.1 Fermentation et extraction des métabolites secondaire sur milieu liquide.....	15
II.12.2 Activité antimicrobienne des métabolites secondaire.....	15
II.13 Dépistage de l'Activité enzymatique.....	16

Résultats et discussion

III.1 Isolement et identification des isolats fongiques.....	18
III.2 Purification des isolats fongique.....	18

III.3 Aspect microscopique et macroscopique des souches fongiques isolées.....	19
III.4 Isolement du genre <i>Bacillus</i> sp	21
III.5 Mise en évidence de l'activité antifongique des isolats rhizosphériques.....	22
III.7 Activité antimicrobienne des filtrats	30
III.8 Activité enzymatique	34
Conclusion et perspectives.....	39
Références bibliographiques	41
Annexes	

Liste des tableaux

Tableau I: Milieux de culture utilisés	9
Tableau II : Activité antifongique des filtrats des isolats bactériens	31

Liste des figures

Figure 1 : Fruits infectés par <i>Alternaria</i> spp. (A) : Moisissure noire de tomate, (B) : pourriture du cœur de la pomme, (C) : pourriture noire du cœur de mandarine (Patriarca et Pinto, 2018).....	2
Figure 2 : A : Grains de blé blanchis ou rosés et ratatinés, B : Des masses de spores fongiques roses à oranges peuvent être présentes sur les épillets infectés (Wise et al., 2015).....	4
Figure 3 : Aperçu des interactions entre les plantes et les PGPR dans la rhizosphère (Shah et al., 2021).	6
Figure 4 : <i>Globularia alypum</i> , Tassalgha (Personnel, 2024).	8
Figure 5 : Localisation du site d'échantillonnage	9
Figure 6 : Méthode d'échantillonnage (Personnel, Teniet En Nasr 2024)	10
Figure 7 : Méthode d'isolement des champignons phytopathogènes (Personnel, 2024).	11
Figure 8 : Protocole d'isolement et purification des souches fongiques (Nacef et al., 2022).	12
Figure 9 : Méthode de préparation des dilutions décimales (Personnel, 2024).	14
Figure 10 : Méthode des puits pour tester les métabolites secondaires.	16
Figure 11 : mise en évidence de l'activité enzymatiques des isolats bactériennes.	17
Figure 12 : Aspect macroscopique des isolats fongiques. Aspect 1 (A), Aspect 2 (B), Aspect 3 (C).....	18
Figure 13 : Aspect macroscopique des trois isolats fongiques après la purification. (a) <i>Ulocladium botrytis</i> , (b) <i>Fusarium oxysporum</i> , (c) <i>Alternaria alternata</i>	18
Figure 14 : Aspect macroscopique et microscopique des champignons phytopathogènes. A : <i>Ulocladium botrytis</i> , B : <i>Fusarium oxysporum</i> , C : <i>Alternaria alternata</i>	20
Figure 15 : les différentes souches d'isolats du genre <i>Bacillus</i> sp.....	21
Figure 16 : Pourcentage des isolats rhizosphériques actifs contre <i>Alternaria alternata</i>	22
Figure 17 : Pourcentage des isolats rhizosphériques actifs contre <i>Fusarium oxysporum</i>	23
Figure 18 : Pourcentage des isolats rhizosphériques actifs contre <i>Ulocladium botrytis</i>	23
Figure 19 : Pourcentage d'inhibition d' <i>Alternaria alternata</i> par les isolats rhizosphériques.....	24
Figure 21 : Pourcentage d'inhibition d' <i>Ulocladium botrytis</i> par les isolats rhizosphériques.	25
Figure 22 : Exemples de quelques isolats actifs contre les champignons phytopathogènes	27
Figure 23 : Zones d'inhibition obtenues par les isolats les plus actifs contre les bactéries pathogènes.....	29
Figure 24 : quelques isolats actifs contre les bactéries pathogènes.....	30
Figure 25 : Activité antifongique des filtrats obtenues par la méthode des puits.....	32
Figure 26 : Index enzymatique de l'activité celluloses des isolats les plus actifs.....	35
Figure 27 : Activité celluloses des isolats les plus actifs.	35
Figure 28 : Index enzymatique de l'activité protéolytique des isolats les plus actifs.	36
Figure 29 : Activité protéolytique des isolats les plus actifs.....	36

Liste des abréviations

- **BN** Bouillons Nutritif
- **CCLS** Coopératif des céréales et des légumes secs
- **CMC** carboxyméthylcellulose
- **GN** Gélose nutritif
- **IE** Index enzymatique
- **PCA** Plate Count Agar
- **PDA** Potato Dextrose Agar
- **PGPR** Plant Growth Promoting Rhizobacteria
- **PIC** Pourcentage d'inhibition de la croissance
- **SM** Solution mère
- **SNA** Surnageants acellulaires
- **UFC** unité formant colonie

Introduction

I.1 Introduction

Les pathogènes et les ravageurs des cultures représentent une menace significative pour le rendement et la qualité de la production agricole. Leur présence entraîne d'importantes pertes économiques et compromet la sécurité alimentaire à différents niveaux, qu'il s'agisse des ménages, à l'échelle nationale ou mondiale. En moyenne, ces organismes nuisibles sont responsables de la destruction de 10 à 28 % de la production végétale mondiale (Savary *et al.*, 2019). L'émergence des bactéries multirésistantes menace gravement la santé publique, rendant les infections difficiles à traiter et augmentant le risque de complications graves. Ce phénomène, observé à l'échelle mondiale, compromet l'efficacité des antibiotiques traditionnels et nécessite des mesures urgentes pour prévenir sa propagation. Ces micro-organismes sont responsables d'un large éventail de maladies, affectant à la fois les cultures agricoles et la santé humaine, et engendrant des conséquences économiques et sociales significatives (Bouhamed *et al.*, 2021).

Les champignons phytopathogènes induisent une variété de symptômes sur les plantes, pouvant se manifester localement ou globalement, de manière simultanée ou successive. Typiquement, ils entraînent des nécroses des tissus végétaux et souvent un développement limité, voire un rabougrissement, des organes ou des plantes dans leur ensemble. Dans de nombreux cas de maladies, le pathogène fongique se développe ou génère diverses structures à la surface de l'hôte, telles que le mycélium, les sclérotés, les sporophores, les fructifications et les spores, désignées collectivement comme des "signes" (Foughalia, 2022). Parmi les champignons phytopathogènes étudiés dans ce contexte, on retrouve *Alternaria* sp, *Fusarium* sp et *Ulocladium* sp.

Les espèces appartenant au genre *Alternaria* sont extrêmement répandues dans divers habitats, Un certain nombre de ces espèces qui possèdent de grandes conidies provoquent des maladies économiquement importantes sur la pomme de terre et la tomate comme *A. solani* et *A. grandis* sur *Solanum tuberosum* et *A. linariae*, *A. subtropica* et *A. elegans* sur *S. lycopersicum*, A ces dernières, il faut ajouter d'autres espèces à petites conidies comme *A. alternata*, *A. arborescens*, *A. infectoria* et *A. tenuissima* qui ont été également signalées sur tomate et sur pomme de terre (Ayad, 2019). Les champignons du genre *Alternaria* appartiennent à la classe des *Deutéromycètes*, qui regroupe tous les champignons caractérisés par un mycélium cloisonné et une reproduction généralement asexuée par conidies. Certaines espèces d'*Alternaria* peuvent avoir une reproduction sexuée, leur forme parfaite appartenant alors à la classe des *Loculoascomycètes*. Ils sont classés dans l'ordre des hyphales, avec des conidiophores peu différenciés, libres, dispersés sur le substrat, et une

croissance sympodiale. Leur mycélium et leurs conidies sont généralement foncés, ce qui les place dans la famille des *Dematiaceae* (Achetbi et al., 2021).

Par exemple, les souches d'*A. alternata* potentiellement dangereuses pour la sécurité alimentaire de celles qui ne présentent qu'une présence endophytique (De Mers, 2022). Les symptômes courants de l'infection à *Alternaria* sont des lésions nécrotiques sur feuilles, principalement concentriques et souvent entourées de tissu chlorotique jaune. Dans Ces dernières années, caractérisées par des étés chauds et secs, le mildiou s'est répandu dans les régions centrales et méridionales de la Russie et de l'Europe et est devenu l'un des plus importants les maladies de la pomme de terre étant inférieures au mildiou (Patriarca et Pinto, 2018). Par la suite, l'alternariose est devenue une préoccupation croissante pour les agriculteurs cultivant des pommes de terre, des tomates et d'autres plantes de la famille des Solanacées. En Algérie, trois espèces, *A. solani*, *A. linariae* et *A. alternata*, ont été identifiées comme étant responsables de l'alternariose sur les pommes de terre et les tomates. Les symptômes distinctifs de l'alternariose se manifestent sur le feuillage par des lésions nécrotiques de couleur brun foncé, généralement de petite taille, avec des anneaux concentriques, donnant l'apparence de cibles, communément appelées "arget spots". Ces lésions sont souvent entourées d'un halo jaunâtre. Les souches d'*Alternaria* peuvent également entraîner des pourritures sur les fruits en mûrissant, se manifestant par une couche noire et veloutée de mycélium et de spores à leur surface. Pour les tomates, une petite lésion externe peut indiquer une infection plus étendue à l'intérieur du fruit (Ayad, 2019).

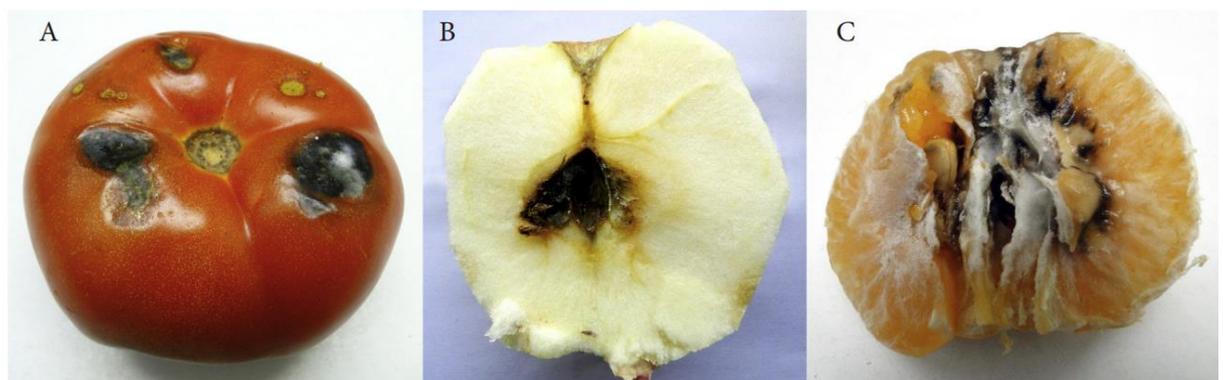


Figure 1 : Fruits infectés par *Alternaria* spp. (A) : Moisissure noire de tomate, (B) : pourriture du cœur de la pomme, (C) : pourriture noire du cœur de mandarine (Patriarca et Pinto, 2018).

De 1809 à 1935, la recherche sur *Fusarium* était principalement axée sur l'identification des espèces de ce genre et le diagnostic de la fusariose, la maladie qu'il engendre. Au cours des cent dernières années, la taxonomie de *Fusarium* a été sujette à de

nombreuses modifications et révisions (**Babadoost, 2018**). Le genre *Fusarium* abrite des pathogènes potentiellement dommageables pour les humains, les animaux et les plantes, en infectant notamment les légumes, les céréales et les graines. Les complexes *Fusarium oxysporum*, *F. solani* et *F. fujikuroi* revêtent une importance considérable à l'échelle mondiale, agissant comme agents pathogènes tant pour les végétaux que pour les humains et les animaux (**Askun, 2018**). Le genre *Fusarium* est classé dans le phylum des *Ascomycota*, dans la classe des *Pezizomycotina*, l'ordre des *Hypocreales*, et la famille des *Nectriaceae*. (**O'donell et al., 2015**).

Depuis les années 1990, la fusariose de l'épi représente un défi majeur pour les cultures de blé à l'échelle mondiale, en raison de l'augmentation des épidémies dans de nombreuses régions productrices de blé, telles que les États-Unis, le Canada, l'Europe et la Chine. Cette maladie altère la qualité nutritionnelle des grains et pose des problèmes de santé significatifs tout au long de la chaîne alimentaire en contaminant les grains avec des mycotoxines résistantes aux procédés de transformation. Ces contaminations entraînent d'importantes pertes de qualité et de rendement, ce qui est incompatible avec la croissance continue des besoins alimentaires de la population humaine (**Fabre, 2020**).

Actuellement, la fusariose des céréales est une maladie très répandue dans toutes les régions céréalières des zones tempérées à travers le monde, Elle est causée par une vingtaine d'espèces du genre *Fusarium*. Certaines de ces espèces, telles que *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. poae*, *F. proliferatum*, *F. avenaceum*, et *F. verticillium*, sont bien connues pour leur implication dans la fusariose, tandis que d'autres, comme *F. solani* et *F. oxysporum*, sont considérées comme des parasites secondaires ou de simples saprophytes (**Houmaïri et al., 2017**). Les symptômes de la maladie se manifestent principalement dans la partie supérieure de la plante, incluant l'épi et parfois le cou. Un indicateur précoce est le blanchiment des épillets, contrastant avec le vert des épillets sains. L'infection peut se propager le long de la rachis, affectant les épillets adjacents. Pour l'orge, les épillets infectés sont localisés et ne se propagent pas aussi facilement. Par temps humide, des spores roses à orange peuvent être observées sur les épillets infectés, tandis que des conditions chaudes et sèches favorisent la progression de la maladie (**Matny, 2015**).



Figure 2 : A : Grains de blé blanchis ou rosés et ratatinés, **B :** Des masses de spores fongiques roses à oranges peuvent être présentes sur les épillets infectés (Wise et al., 2015).

Le genre fongique *Ulocladium* sp, appartenant à la famille des *Pleosporaceae*, englobe diverses espèces aux fonctions écologiques et applications biotechnologiques variées. Certaines de ces espèces sont responsables de maladies végétales telles que la tâche des feuilles de concombre, d'autres sont impliquées dans la détérioration des aliments comme les noix, tandis que certaines sont utilisées dans des stratégies de biocontrôle (Abdel-Wahab et al., 2018).

Les pesticides, comprenant les fongicides, les insecticides et les herbicides, sont généralement toxiques pour les organismes vivants en raison de leur fonction, ce qui engendre un risque lors de leur utilisation. Ces dernières années, une prise de conscience croissante des effets nocifs des pesticides dans l'agriculture a émergé parmi le public, les gouvernements et la communauté scientifique. Afin de protéger la santé publique et l'environnement, l'utilisation des produits phytosanitaires est réglementée par la législation sur les produits antiparasitaires (Demeule, 2020).

Ainsi, la lutte biologique émerge comme une solution prometteuse examinée attentivement par les chercheurs du monde entier. Cette approche implique l'utilisation de produits vivants tels que les micro-organismes, ou d'éléments non vivants d'origine naturelle comme les huiles essentielles et les extraits de plantes, pour contrôler les maladies végétales. Parmi les agents de lutte biologique, les biopesticides à base de microorganismes commencent à occuper une place importante sur le marché des agents de biocontrôle. Cependant, aucun bio-fongicide d'origine microbienne n'a été homologué ou autorisé pour une utilisation agricole afin de contrer les maladies cryptogamiques (Foughalia, 2022). Cette lacune sur le marché algérien en matière de bio-fongicides d'origine microbienne nous

pousse à rechercher et à développer de nouveaux agents de lutte biologique contre les champignons phytopathogènes.

Dans le domaine de la lutte biologique, les PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria ou Rhizobactéries promoteurs de la croissance des plantes) sont des stimulateurs de croissance essentiels pour les plantes en agriculture durable. Les micro-organismes présents dans la rhizosphère sont des microbes bénéfiques qui utilisent diverses stratégies pour favoriser la croissance des plantes. Les PGPR apportent d'importantes contributions à l'agriculture respectueuse de l'environnement, tant par des moyens directs que par des moyens indirects, pour stimuler le développement des plantes (**Hasan et al., 2023**). Directement, ils fournissent des composés synthétisés, comme des enzymes antioxydantes, ou facilitent l'absorption de certains nutriments de l'environnement. Indirectement, ils produisent des substances antagonistes ou induisent une résistance, permettant de réduire voire de prévenir les effets néfastes d'un ou plusieurs organismes phytopathogènes. Ainsi, les PGPR sont hautement prometteuses pour l'agriculture durable, en particulier dans la culture du blé, et peuvent être exploitées commercialement (**Van Gansberghe et al., 2021**).

Des recherches ont été menées sur l'effet promoteur de croissance des PGPR sur différentes espèces de cultures agricoles, avec des résultats prometteurs. Dans une étude, les plantes de riz soumises au stress salin et traitées avec des PGPR, notamment *Bacillus pumilus* et *Pseudomonas pseudoalcaligenes*, ont montré une atténuation de la réponse au stress. De plus, ces plantes ont présenté une germination plus élevée (16%), une survie (8%), un poids sec (27%), une hauteur de plante (31%) et une concentration cellulaire réduite en sodium (71%) et en calcium (36%). Ces résultats soulignent tous la promotion de la croissance et l'atténuation du stress salin induites par l'inoculation de PGPR. Dans une étude récente menée en Chine, l'application de PGPR sous forme de *Pseudomonas mosselii*, *Bacillus thuringiensis* et *Bacillus* sp JBS-28 dans des champs de riz contaminés par l'arsenic a conduit à une diminution de la concentration en arsenic et a favorisé la croissance du riz, comme en témoigne une augmentation du rendement en grains observée en conditions de serre et sur le terrain (**Sinha et al., 2021**).

Bacillus spp. Représentent les bactéries prédominantes du sol et de la rhizosphère, où elles représentent jusqu'à 95 % des populations bactériennes à Gram positif. De plus, elles font partie des bactéries endophytes les plus répandues (**Miljakovic et al., 2020**). Les *Bacillus* spp., étroitement associés aux plantes et à l'environnement du sol, sont utilisés dans la lutte biologique en raison de leur capacité à produire des molécules bioactives pouvant

inhiber les agents phytopathogènes. L'hétérogénéité des *Bacillus* se reflète également dans leur ADN, présentant une variation de leur contenu en G+C allant de 32 à 66 %. En moyenne, le genre *Bacillus* contient environ 4973 ± 923 gènes. Ces bactéries se présentent sous forme de bâtonnets droits ou légèrement recourbés, se trouvant seules, en paires, parfois en chaînes, et occasionnellement en longs filaments. Elles se distinguent des autres membres des Bacillaceae par leur nature aérobie stricte ou facultative. Les *Bacillus* sont phénotypiquement et génétiquement hétérogènes (Giroux, 2015).

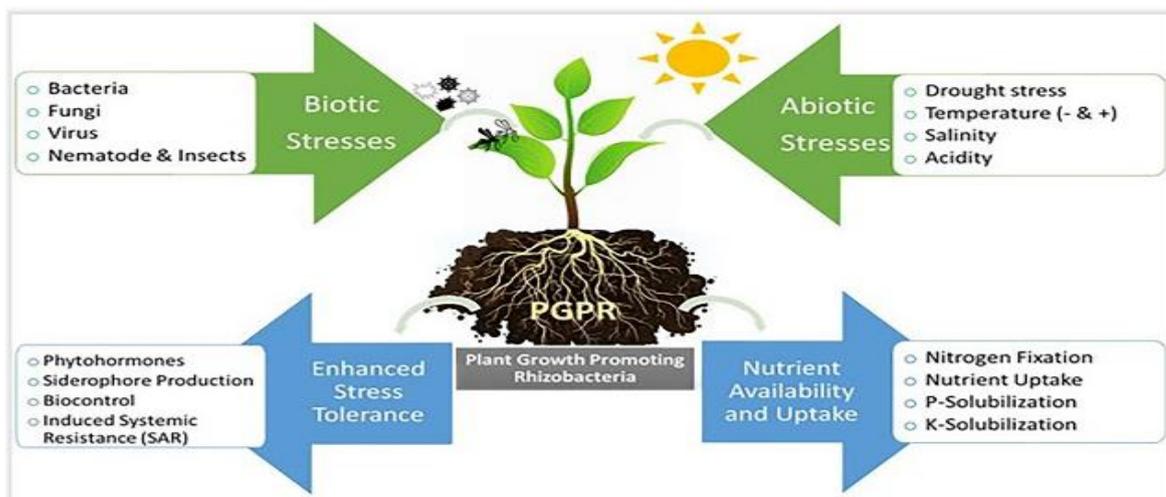


Figure 3 : Aperçu des interactions entre les plantes et les PGPR dans la rhizosphère (Shah et al., 2021).

L'émergence croissante des champignons phytopathogènes et des bactéries multirésistantes constitue un défi majeur pour l'agriculture et la santé publique, menaçant la sécurité alimentaire et la santé humaine tout en entraînant d'importantes pertes économiques. Pour faire face à cette problématique, les PGPR émergent comme une alternative prometteuse aux pesticides et aux antibiotiques traditionnels, offrant des stratégies biologiques efficaces pour contrôler ces agents pathogènes tout en favorisant la croissance des plantes de manière durable et respectueuse de l'environnement. Cette approche innovante présente un potentiel significatif pour répondre aux défis actuels liés à la protection des cultures et à la lutte contre les infections bactériennes résistantes.

Dans le cadre de cette étude, nous avons examiné les souches de *Bacillus* sp. isolées à partir de la rhizosphère de la plante médicinale algérienne *Globularia alypum*, dans le but d'évaluer leurs activités antagonistes contre les champignons phytopathogènes et les bactéries pathogènes. Notre objectif est d'enrichir les connaissances dans le domaine de la lutte biologique en mettant en évidence le potentiel antagoniste de ces souches.

Matériel et méthodes

Dans ce chapitre, nous allons détailler les protocoles et les approches employés pour évaluer les capacités antagonistes des souches rhizobiennes vis-à-vis de trois espèces de champignons phytopathogènes, isolées à partir de la tomate et du blé dur et trois bactéries pathogènes pour l'homme, dans un environnement in vitro contrôlé. Cette étude a été réalisée au niveau du laboratoire de Microbiologie, département des sciences biologiques de l'université de Bordj Bou Arreridj.

II. Matériel et méthodes

II.1. Matériel

II.1.1. Matériel microbien

Pour cette étude, nous avons utilisé trois souches fongiques pathogènes isolées à partir de la tomate et du blé dur, présentant des symptômes de maladies, à savoir *Alternaria alternata*, *Fusarium oxysporum* et *Ulocladium botrytis*. De plus, trois souches bactériennes pathogènes pour l'homme ont également été utilisées, fournies par le laboratoire de microbiologie de l'Université Mohamed el Bachir el Ibrahimi à Bordj Bou Arreridj. Ces souches comprennent *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 et *Micrococcus luteus* NRLL B-4375.

II.1.2 Matériel végétal

La plante utilisée lors de cette étude est une plante médicinale appelée *Globularia alupum* (Tassalgha) (Friscic et al., 2022). Elle a été prélevée le 24/02/2024 dans la région de Teniet En Nasr, Daïra de Medjana, wilaya de Bordj Bou Arreridj. Alors que la variété de blé dur Oued El Bered a été obtenue de CCLS de Bordj Bou Arreridj (**annexe 1**).



Figure 4 : *Globularia alupum*, Tassalgha (Personnel, 2024).

II.2 Milieux de culture

Selon les exigences expérimentales, différents types de milieux de culture sont utilisés. Sélectionner un milieu de culture approprié est crucial pour favoriser la croissance optimale des micro-organismes étudiés. Cinq milieux de culture ont été employés, comme précisé dans le tableau 1 ci-dessous. Tous les milieux de culture utilisés proviennent du laboratoire de Microbiologie appliquée de l'Université Mohamed El Bachir El Ibrahimi de Bordj Bou Arreridj.

Tableau I: Milieux de culture utilisés

Milieux de culture	Abréviation	Utilisation
Gélose nutritive et Plate Count Agar	GN et PCA	La culture des souches rhizobiens
Potato Dextrose Agar	PDA	L'isolement et la purification des isolats fongiques
Bouillon nutritive	BN	La conservation des souches bactériennes
Carboxyméthylcellulose	CMC	Recherche de la cellulase

II.3 Site d'échantillonnage

Le site choisi pour prélever les échantillons se situe au nord-ouest de la wilaya de Bordj Bou Arreridj, à environ 30 km de là, dans la région de Teniet En Nasr, Daïra de Medjana, (36° 13' 53" NORD, 4° 36' 04" EST) (**Figure 5**).

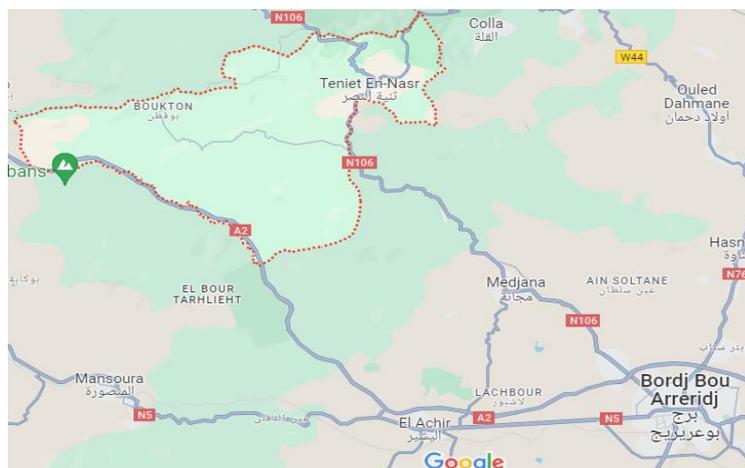


Figure 5 : Localisation du site d'échantillonnage

II.4 Échantillonnage et prélèvement

Des échantillons de sol de la rhizosphère de la plante médicinale *Globularia alypum* ont été collectés le 24 février 2024 en utilisant des outils stériles afin de prévenir toute contamination. Les échantillons ont été placés dans des sacs en plastique stériles et transportés au laboratoire pour être conservés à 4 °C avant leur traitement ultérieur (Sadрати et al., 2021).



Figure 6 : Méthode d'échantillonnage (Personnel, Teniet En Nasr 2024).

II.5 Isolement de l'agent pathogène

Pour isoler les champignons phytopathogènes, des outils stériles ont été utilisés pour éviter la contamination. En février 2024, des champignons pathogènes ont été isolés à partir de la tomate et du blé dur. Les échantillons de tomate présentant des symptômes pathologiques ont été lavés à l'eau du robinet, puis coupés avec un couteau stérile en petits morceaux. Ces morceaux ainsi que les graines de blé ont ensuite été immergés séparément dans de l'eau de Javel à 2% pendant respectivement 1 et 4 minutes. Ensuite, ils ont été rincés trois fois successives dans de l'eau distillée stérilisée pendant 1 minute pour chaque fois pour

éliminer les résidus de l'eau de Javel. Après séchage sur du papier filtre stérile, cinq ou six morceaux de tomate et six graines de blé ont été transférés de manière aseptique sur des boîtes de Pétri contenant de l'Agar Dextrose de Pomme de Terre (PDA) enrichi en antibiotiques, notamment la pénicilline et la gentamicine (30 mg/L) pour supprimer la croissance bactérienne. Toutes les boîtes de Pétri ont été incubées à 28°C pendant une durée suffisante pour favoriser la croissance fongique. Après l'incubation, chaque champignon ayant poussé a été repiqué plusieurs fois jusqu'à l'obtention d'une culture pure et conservé sur PDA incliné (**Zerroug et al., 2018**).



Figure 7 : Méthode d'isolement des champignons phytopathogènes (**Personnel, 2024**).

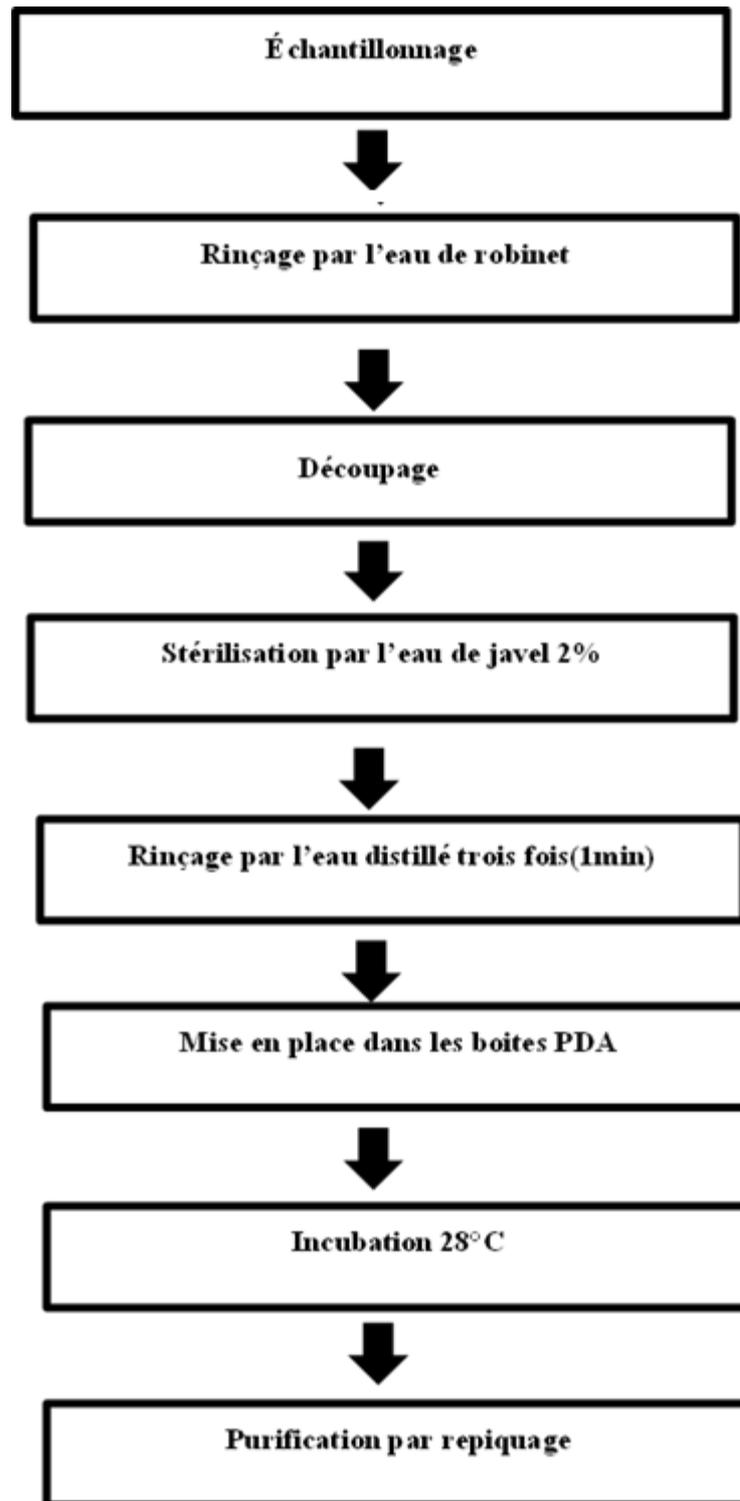


Figure 8 : Protocole d'isolement et purification des souches fongiques (Nacef et *al.*, 2022).

II.6 Identification des isolats fongiques

Les champignons phytopathogène ont été identifiés en se basant sur les caractéristiques morphologiques tant que macroscopique et microscopique :

II.6.1 Observation macroscopiques

Cette méthode repose sur l'observation des caractéristiques morphologiques des hyphes, incluant la texture, la forme et la taille des colonies, l'aspect de la surface des colonies, l'odeur, la coloration et la vitesse de croissance (**Dufresne, 2021**).

II.6.2 Observation microscopique

Pour réaliser l'identification microscopique, le processus implique la préparation de frottis avec du bleu de méthylène sur une lame, suivi d'une observation microscopique des critères suivants : Les propriétés des hyphes notamment leur couleur, la production de différentes fructifications telle que les spononies, les pycnidies et les corenies, ainsi que l'évaluation de la couleur, de la taille et de la forme de ses fructifications. De plus, le mécanisme de production des spores est analysé pour identifier ses caractéristiques spécifiques (**Sadrati et al., 2021**).

II.7 Isolement du genre *Bacillus*

Pour isoler le genre *Bacillus* à partir des échantillons de sol rhizosphérique, la méthode de dilution et d'ensemencement sur milieu de culture GN est employée. Un gramme d'échantillon de sol est suspendu dans 9 ml d'eau physiologique pour former une solution mère SM. Les échantillons sont soumis à un choc thermique en les plaçant dans un bain-marie à 80°C pendant 20 minutes afin d'éliminer toute forme végétative. Après quelques minutes d'agitation à l'aide d'un vortex, des dilutions appropriées sont réalisées par dilution décimale (jusqu'à 10^{-7}). À l'aide d'une pipette pasteur stérile sous forme de râteau, 0,1 ml de chaque dilution a été étalé sur la surface d'un milieu gélose nutritive (GN). Après incubation pendant 24 heures à 30°C, les colonies obtenues sont purifiées et conservées (**Meddas et al., 2020**).



Figure 9 : Méthode de préparation des dilutions décimales (Personnel, 2024).

II.8 La purification des isolats

La purification des isolats est une étape essentielle de notre travail. Après la période d'incubation, les colonies de *Bacillus* ayant poussé sur le milieu de culture GN sont examinées pour leur aspect macroscopique. Chaque colonie présentant un aspect différent des autres est ensuite purifiée en effectuant des repiquages successifs sur le même milieu d'isolement GN, selon la technique des 4 quadrants (Cox et al., 2016).

II.9 La conservation des isolats bactérienne

Les colonies pures sont conservées dans des tubes à essai contenant 5 mL de milieu liquide BN. Elles sont ensemencées à l'aide d'une anse de platine stérile, puis incubées à une température de 30°C pendant 24 à 48 heures. Pour une conservation à court terme, les tubes présentant une croissance bactérienne sont ensuite stockés à 4°C dans le réfrigérateur (Meddas et al., 2020).

II.10 Dépistage de l'activité antagoniste contre les champignons phytopathogènes

Le potentiel antagoniste des isolats rhizosphériques a été évalué selon la technique de double culture, tel que décrit par Ali et al. (2022), avec quelques ajustements. Un petit disque d'agar portant le mycélium fongique (de diamètre de 5 mm) a été prélevé sur le bord de croissance active d'une boîte récemment cultivée, puis déposé au centre d'une boîte de PDA nouvellement préparée. Les isolats bactériens ont été cultivés dans du bouillon nutritive (BN) à 30°C pendant 24 heures. Par la suite, les isolats (environ 2 µL) ont été inoculés par spot à une distance de 25 mm du disque fongique. Un témoin négatif a été maintenu en utilisant uniquement le disque fongique au centre. Après incubation des plaques à 28 °C pendant 5-7 jours, les pourcentages d'inhibition ont été calculés en appliquant cette équation :

$$\text{Pourcentage d'inhibition (\%)} = \frac{X-Y}{X} \times 100$$

où **X** = diamètre mycélien du champignon en l'absence de bactéries antagonistes ; **Y** = diamètre mycélien du champignon en présence de bactéries antagonistes. Pour chaque traitement, deux répliques ont été réalisés.

Le pourcentage d'inhibition a été classé selon un niveau allant de faible à une activité fongique très élevé ; 30 à 40% : faible activité ; 50 à 60% : activité moyenne ; 60 à 70% : bonne activité ; >70 % : excellente activité (**Hajji et al., 2016**)

II.11 Criblage de l'activité antibactérienne

Le dépistage visant à déterminer l'activité antibactérienne contre les bactéries pathogènes pour l'homme a été réalisé en utilisant la méthode de superposition (double couche). Les cultures pures ont été inoculées en double sur le milieu gélose nutritif à une distance d'environ ± 1 cm du bord de la boîte. Après une incubation de 24 heures à 20°C, la surface du milieu a été recouverte de 7 mL d'un milieu semi-solide de gélose nutritive (0,7 % d'agar (p/v)) contenant 1 mL de bactéries pathogènes pour l'homme. Toutes les boîtes ont ensuite été incubées aérobiquement à 37°C pendant 24 heures. L'activité antibactérienne des isolats a été déterminée en mesurant le diamètre de la zone d'inhibition en millimètres autour des isolats bactériens (**Prastiyanto et al., 2022**).

II.12 Activité antimicrobienne

II.12.1 Fermentation et extraction des métabolites secondaire sur milieu liquide

Les bactéries sont d'abord inoculées par strie sériée sur un milieu GN et incubées à 28°C pendant 24 heures. Ensuite, une colonie bactérienne est transférée dans chaque flacon de 10 ml de milieu BN modifié à l'aide d'une boucle de platine stérile. Ces flacons sont placés dans un agitateur électrique pour assurer une agitation homogène et sont incubés à 28°C pendant 72 heures. Après cette période, les fermentations sont centrifugées à 8000 tours par minute pendant 15 minutes à 4°C pour obtenir les surnageants acellulaires (SNA). Tous les SNA sont stérilisés par filtration à travers un filtre en cellulose de 0,2 μ m de taille de pores.

II.12.2 Activité antimicrobienne des métabolites secondaire

Ce test repose sur la technique des puits ; dans un premier temps, des suspensions bactériennes (10^8 UFC/mL) pour *E. coli*, *S. aureus* et *M. luteus* ainsi que des suspensions sporales (10^6 spore/mL) pour les champignons sont préparées en plaçant des colonies dans des tubes à essai stériles contenant de l'eau physiologique. Ensuite, les suspensions sont étalées en strie sériée sur la surface de milieux de culture spécifiques (GN pour les bactéries et PDA pour les champignons) à l'aide d'un écouvillon stérile. Par la suite, des puits (trois par boîte) sont découpés à l'aide d'embouts bleus stériles (diamètre de 5 mm). Dans chaque

puits, 35 μ L de gélose molle sont ajoutés, suivis de 50 μ L de filtrat de chaque isolat, tandis qu'un puits témoin est rempli avec le milieu de fermentation seul. Les boîtes sont incubées à 37°C pendant 24 heures pour les milieux bactériens et à 28°C pendant 3 jours pour les milieux fongiques (**Benzohra et al., 2019, Baptista et al., 2022**).

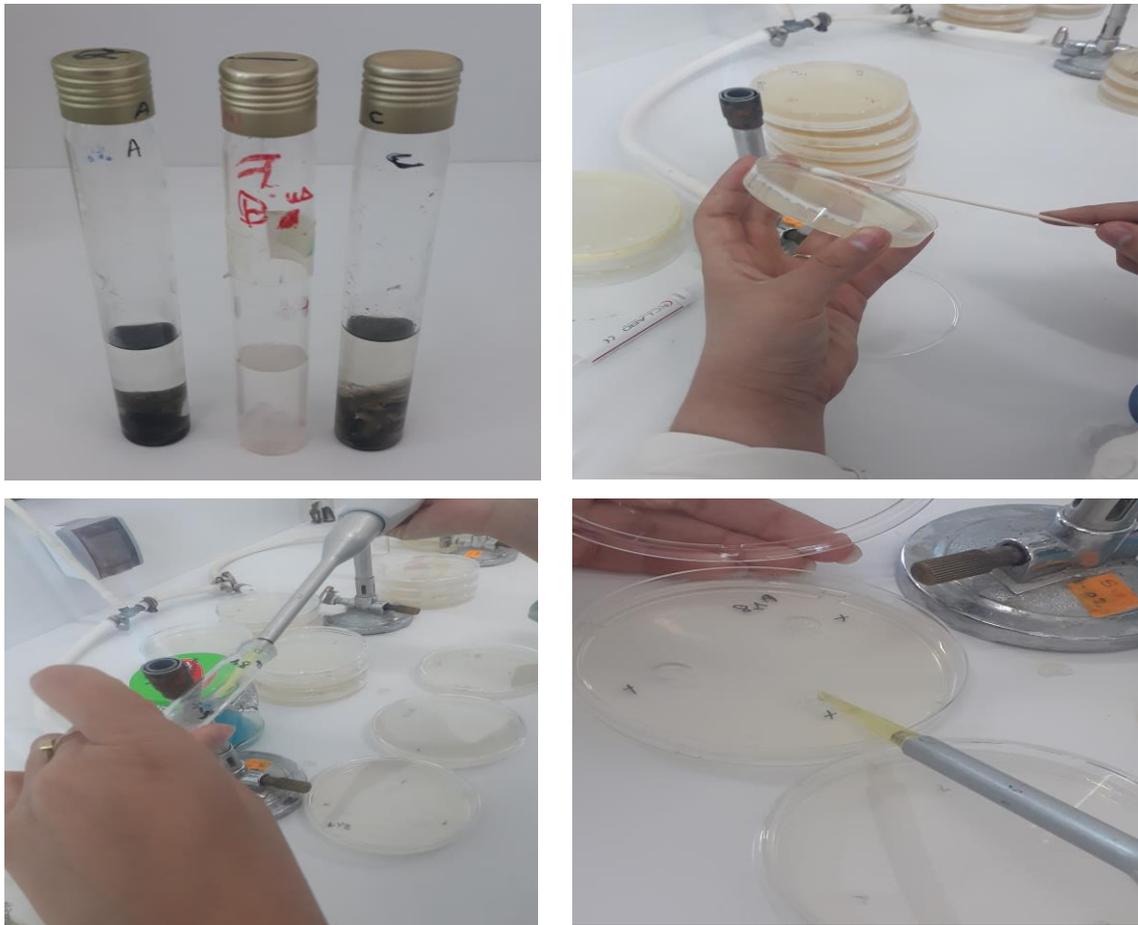


Figure 10 : Méthode des puits pour tester les métabolites secondaires.

II.13 Dépistage de l'Activité enzymatique

Dans le but d'évaluer l'efficacité des isolats dans l'amendement des sols et la lutte contre les champignons phytopathogènes, diverses activités enzymatiques ont été étudiées. Ces activités ont été mises en évidence sur des milieux gélosés en utilisant des substrats spécifiques comme unique source de carbone (**annexe 2**). Pour chaque réaction enzymatique, 10 μ L de chaque suspension bactérienne (âgée de 24 heures) ont été déposés à la surface du milieu approprié, puis incubés à 28°C.

Un test d'activité amylolytique a été réalisé sur gélose à base d'amidon pour évaluer la capacité des souches à dégrader l'amidon soluble. Les boîtes ensemencées ont été incubées pendant 72 heures, puis une solution de lugol a été appliquée sur la surface du milieu. Après un certain temps, l'excès a été éliminé et les boîtes ont été lavées à l'eau

distillée. La présence d'amidon résiduel a été détectée par une coloration bleu noirâtre. Pour évaluer l'activité protéolytique, un milieu de base contenant 2 % de solution de lait écrémé a été utilisé. Après une incubation de 72 heures, la présence d'une activité protéasique positive a été indiquée par un halo transparent autour des colonies. L'activité cellulosique a été évaluée en incubant les boîtesensemencées pendant 3 jours sur un milieu de culture contenant la CarboxyMéthylCellulose (CMC). Ensuite, une solution de lugol a été versée sur les colonies et laissée reposer pendant 15 minutes. L'apparition d'un halo clair autour des colonies a indiqué une activité cellulosique (Ayslu et al., 2016).

L'index enzymatique a été estimé par l'équation suivante EI : rapport diamètre du halo / rapport diamètre de la colonie (Dornelas et al., 2017).

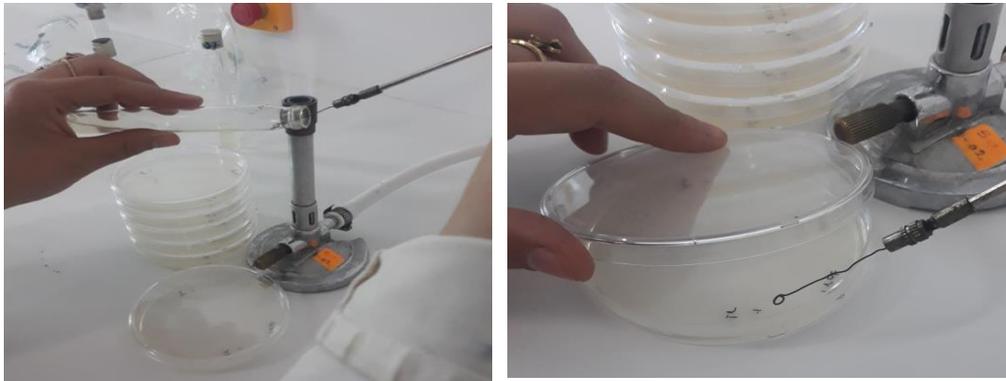


Figure 11 : mise en évidence de l'activité enzymatiques des isolats bactériennes.

Résultats et discussion

III.1 Isolement et identification des isolats fongiques

Cette étude nous a permis d'identifier trois aspects de champignons différents. Leur caractérisation a été réalisée en examinant la couleur et la texture des thalles formés à la surface des boîtes de culture et les caractéristiques microscopiques. Les figures ci-dessus représentent les différents champignons obtenus.

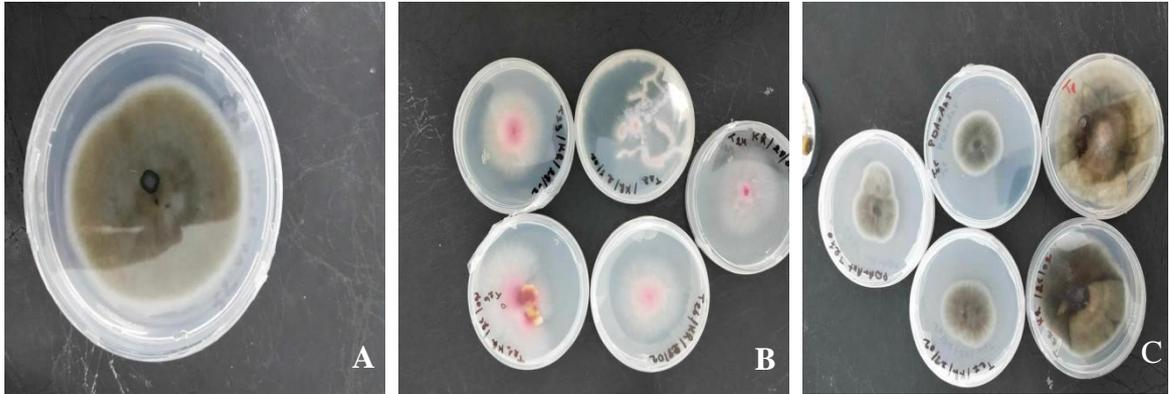


Figure 12 : Aspect macroscopique des isolats fongiques. Aspect 1 (A), Aspect 2 (B), Aspect 3 (C).

III.2 Purification des isolats fongique

La purification des échantillons de blé dur et de tomate a permis d'isoler les champignons phytopathogènes. Cela a conduit à l'obtention de souches fongiques pures, facilitant leur identification tant macroscopique que microscopique (**Figure 13**).



Figure 13 : Aspect macroscopique des trois isolats fongiques après la purification. (a) *Ulocladium botrytis*, (b) *Fusarium oxysporum*, (c) *Alternaria alternata*.

En se basant sur les caractéristiques macroscopiques et microscopiques, les trois isolats purifiés ont été identifiés comme appartenant aux espèces *Alternaria alternata*, *Ulocladium botrytis* et *Fusarium oxysporum* (**figure 14**).

III.3 Aspect microscopique et macroscopique des souches fongiques isolées

Ulocladium botrytis

L'aspect macroscopique d'*Ulocladium botrytis* se caractérise par une croissance rapide, formant des colonies duveteuses de couleur sombre à noire. Ces colonies peuvent présenter une apparence veloutée ou poudreuse avec des nuances de vert, de brun ou de noir, et des bords irréguliers. Sous le microscope, *Ulocladium botrytis* révèle des hyphes septés, généralement foncées, avec des conidiophores érigés portant des conidies. Les conidies sont souvent brunâtres à noires, cylindriques ou en forme de massue, et peuvent être disposées en chaînes. Leurs parois épaisses leur confèrent une apparence distincte (**figure 14A**) (**Imran, 2011**).

Fusarium oxysporum

Les isolats de *Fusarium oxysporum* ont été caractérisés sur la base de la culture et de la morphologie des spores. Les mycéliums étaient blancs à roses avec une teinte violette sur le milieu PDA. Après coloration au bleu de méthylène, l'observation microscopique a révélé la présence de macroconidies en forme de faucille, de microconidies légèrement ovales et unicellulaires, ainsi que des chlamydo-spores globuleuses de taille moyenne, situées aux extrémités ou entre les cellules (**figure 14B**) (**Murugan et al., 2020**).

Alternaria alternata

Les colonies de ces souches présentent une croissance rapide sur milieu PDA. Initialement de couleur verdâtre, elles deviennent rapidement foncées. L'observation microscopique révèle des hyphes septés, avec certains filaments pigmentés en brun. Les conidiophores sont cloisonnés, bruns, pluricellulaires, et de forme piriforme ou ovoïde, avec une partie basale arrondie et une extrémité apicale allongée en bec plus ou moins important (**figure 14C**) (**Mohammadi et Bahramikia, 2019**).

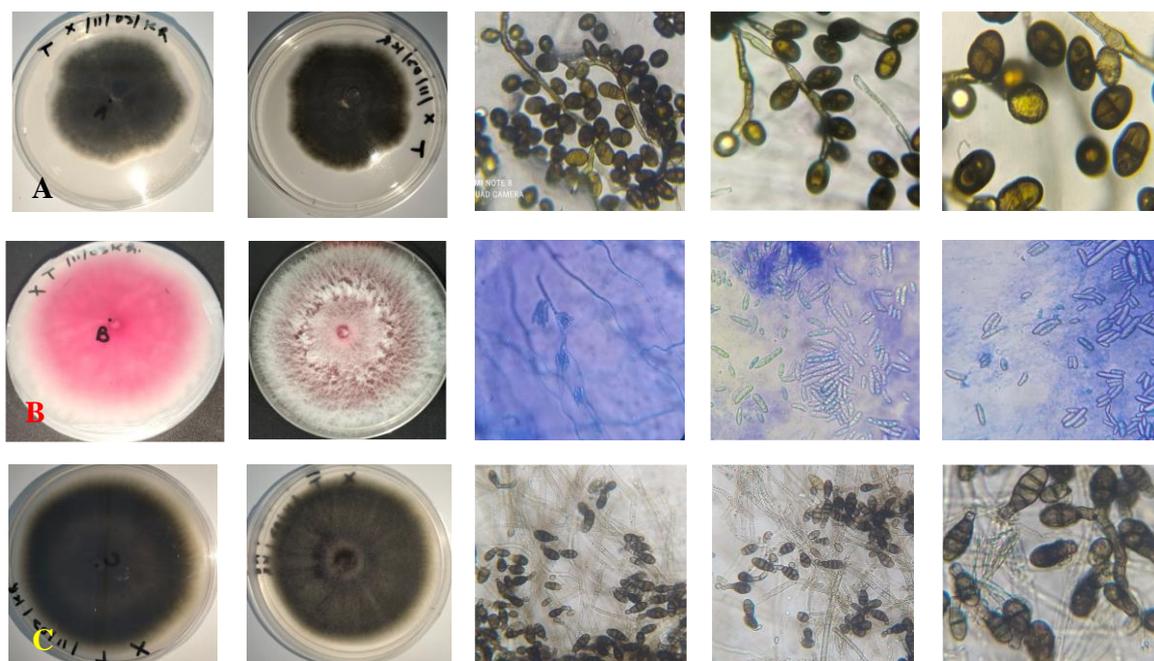


Figure 14 : Aspect macroscopique et microscopique des champignons phytopathogènes.
A : *Ulocladium botrytis*, **B :** *Fusarium oxysporum*, **C :** *Alternaria alternata*.

Selon les études de **Tiendrebeogo et al. (2023)**, *Fusarium oxysporum* a été isolé à partir de la tomate. De même, dans une autre étude de **Houmairi et al. (2017)**, dans la région de la Chaouia au Maroc, il a été observé que les espèces du genre *Fusarium* sont généralement des saprophytes vivant sur les débris organiques dans le sol, mais certaines peuvent devenir parasites de diverses plantes, cultivées ou sauvages, comme le blé, l'orge, le maïs, entre autres. Les résultats de cette étude montrent que le genre *Alternaria* est le plus fréquemment isolé sur le blé dur (60,1 %), suivi par le blé tendre (49,4 %), l'orge (44,4 %) et le maïs (27,9 %). Le genre *Fusarium* est en deuxième position avec une fréquence moyenne de 19,7 %, et des fréquences relatives de 39,7 % pour le blé tendre, 30,9 % pour le maïs, 17,5 % pour le blé dur et 6,9 % pour l'orge, les grains de céréales, notamment le blé, l'orge et le maïs, sont souvent contaminés par des moisissures du type *Alternaria*, *Fusarium*, *Aspergillus*, *Absidia*, et autres. Le blé dur est la céréale la plus colonisée par *Alternaria*, suivi par le blé tendre, l'orge et le maïs, tandis que pour *Fusarium*, le blé tendre et le maïs sont plus envahis que le blé dur et l'orge.

Patriarca et Pinto (2018), ont également isolé *Alternaria alternata* à partir de la tomate. Les taxons d'*Alternaria* sont classés selon leur spécificité d'hôte : *Alternaria mali* est associé aux pommes, *Alternaria gaisen* aux poires, *Alternaria longipes* au tabac, *Alternaria citri* aux agrumes, et *Alternaria arborescens* (syn. *Alternaria alternata* sp. *lycopersici*) à la tomate. Selon **Elazouni et al., (2019)**, en Algérie, les principaux agents responsables de la

détérioration des fruits et légumes commercialisés appartiennent aux genres *Aspergillus*, *Alternaria* et *Fusarium*. Les recherches ont confirmé que les principaux désordres phytopathologiques causant des dégâts sévères sur la tomate sont dus à *F. oxysporum*, *Rhizoctonia* spp. et *Alternaria* spp.

Punja et al., (2016) et **Sajad et al., (2017)**, ont rapporté les principales pourritures pouvant infecter la tomate après la récolte, incluant *Mucor racemosus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus* spp., *Geotrichum candidum*, *Phoma destructiva*, *Sclerotium rolfsii*, *Trichothecium roseum*, *Rhizopus* spp., *Colletotrichum* spp., *Penicillium* spp., *Alternaria* spp., *Stemphylium* spp. et *Cladosporium* sp. Les maladies fongiques peuvent attaquer la plante à n'importe quel stade de son cycle végétatif et sont parfois associées aux semences et tissus vivants. **Al Askar et al., (2014)**, ont isolé 57 espèces fongiques à partir des graines de tomate, illustrant la diversité des agents pathogènes potentiels. dont *Alternaria* spp., *F. oxysporum*, *Cladosporium* spp., *Penicillium* sp., *Aspergillus niger* et *Aspergillus flavus* présentent une fréquence d'apparition très importante.

III.4 Isolement du genre *Bacillus* sp

Les études et les expériences réalisées dans le but de la recherche de nouveaux moyens de protections et de lutte contre les champignons phytopathogènes, ont révélé que le biocontrôle est une méthode d'un grand intérêt industriel et agronomique. 48 colonies bactériennes différentes de genre *Bacillus* sp comme mentionné dans la (**Figure 15**) sont isolées a partir du sol rhizosphérique d'une plante médicinale, et cela sur la base de l'aspect des caractères macroscopiques des colonies sur milieu (GN) (la taille, la forme, la couleur et la surface). Après l'isolement et plusieurs purifications, les colonies bactériennes développées sur le milieu GN sont caractérisées selon leurs aspects macroscopiques.



Figure 15 : les différentes souches d'isolats du genre *Bacillus* sp.

Selon **Odoh, (2017)**, le genre *Bacillus* sp a été identifié comme un genre crucial dans la rhizosphère en raison de son rôle protecteur et stimulant pour les plantes. L'étude de **Marpaung et al., (2021)**, a montré des résultats comparables à notre travail sur l'identification des souches rhizosphériques appartenant au genre *Bacillus*. Ces souches présentent des colonies dont la couleur varie du blanc au beige ou au jaune selon l'espèce spécifique. Elles ont une forme irrégulière avec des bords lobés ou ondulés, sont opaques, et la surface des colonies peut être mate ou brillante. Les colonies peuvent être plates, légèrement convexes ou même bosselées.

III.5 Mise en évidence de l'activité antifongique des isolats rhizosphériques

L'efficacité antifongique de 48 souches de *Bacillus* sp. a été évaluée en mesurant les pourcentages d'inhibition de la croissance (PIC%) à l'égard des agents phytopathogènes affectant la tomate et le blé dur. Les résultats correspondants sont présentés dans la **figure 22** ci-dessus.

Les mesures radiales de chaque test d'antagonisme ont permis d'évaluer l'effet inhibiteur de chaque souche antagoniste sur la croissance mycélienne des champignons. Les résultats ont montré que certains des isolats testés présentaient un effet antagoniste significatif contre les champignons phytopathogènes étudiés, se traduisant par une réduction de leur croissance par rapport au témoin. Selon les PIC% calculés, les valeurs d'inhibition les plus marquantes ont été observées chez les 10 isolats B1, B12, B15, B18, B20, B23, B40, B47, B33 et B48, à l'encontre de la plupart des champignons testés.

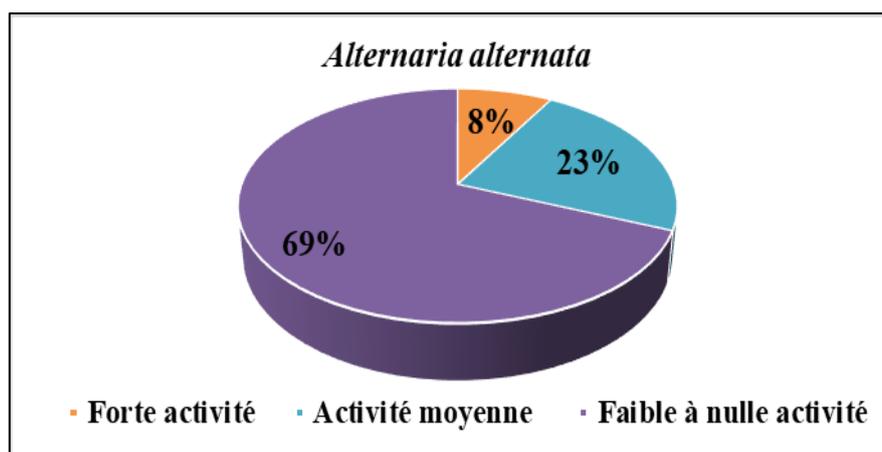


Figure 16 : Pourcentage des isolats rhizosphériques actifs contre *Alternaria alternata*.

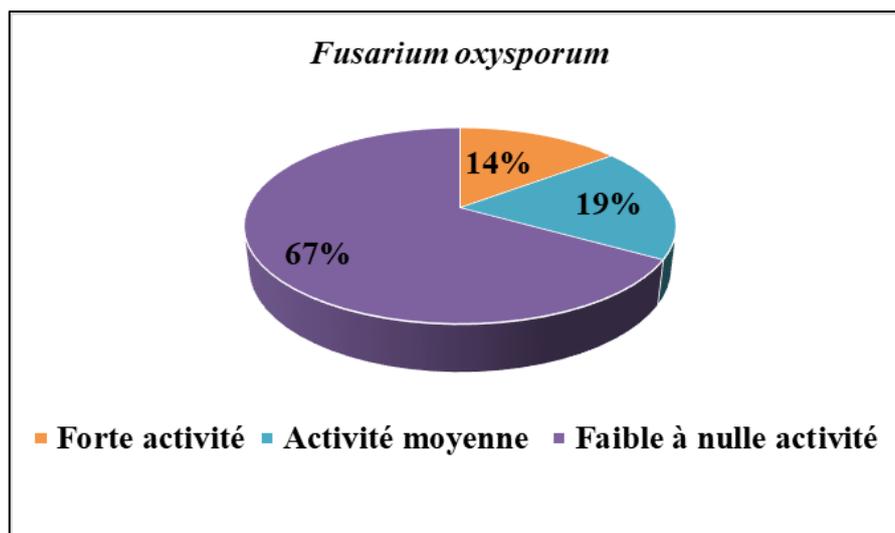


Figure 17 : Pourcentage des isolats rhizosphériques actifs contre *Fusarium oxysporum*.

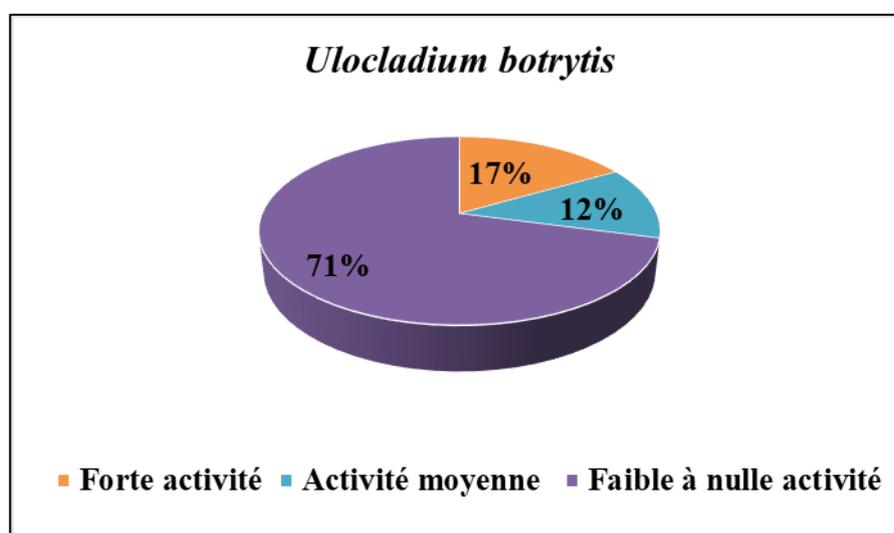


Figure 18 : Pourcentage des isolats rhizosphériques actifs contre *Ulocladium botrytis*.

Selon les résultats obtenus, *U. botrytis* se révèle être le champignon le plus réceptif, suivi de *F. oxysporum* et ensuite d'*A. alternata*. Les expériences in vitro ont révélé que parmi les 48 isolats, 17% ont montré une activité antagoniste forte envers le champignon cible *U. botrytis*, 12% une activité modérée, et 71% une activité faible (**figure 16**). En ce qui concerne *F. oxysporum*, 14% des isolats ont manifesté une activité antagoniste forte, 19% une activité modérée, tandis que 67% ont montré une activité faible (**figure 17**). Pour *A. alternata*, 8% des isolats ont exhibé une activité forte, 23% une activité modérée, et 69% ont montré une activité faible à très faible (**figure 18**).

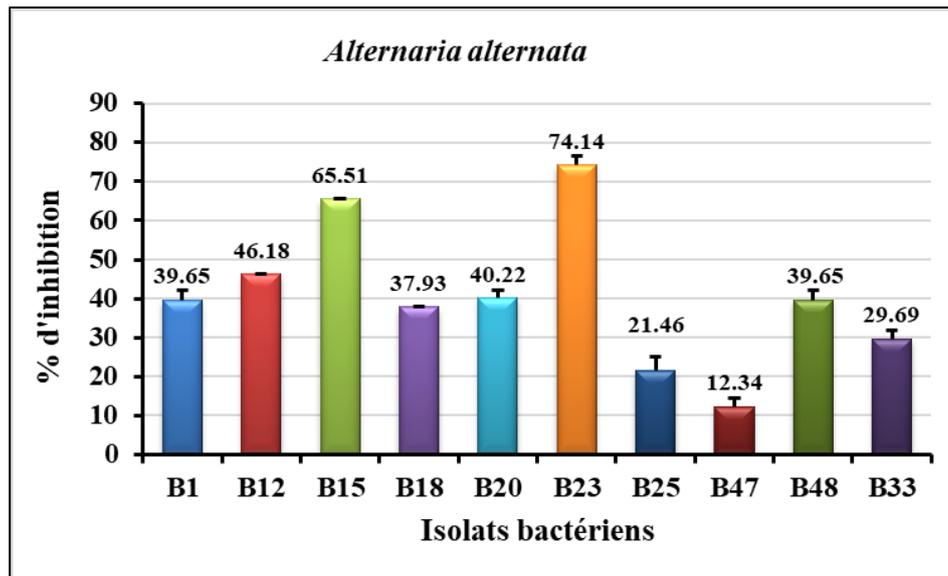


Figure 19 : Pourcentage d'inhibition d'*Alternaria alternata* par les isolats rhizosphériques.

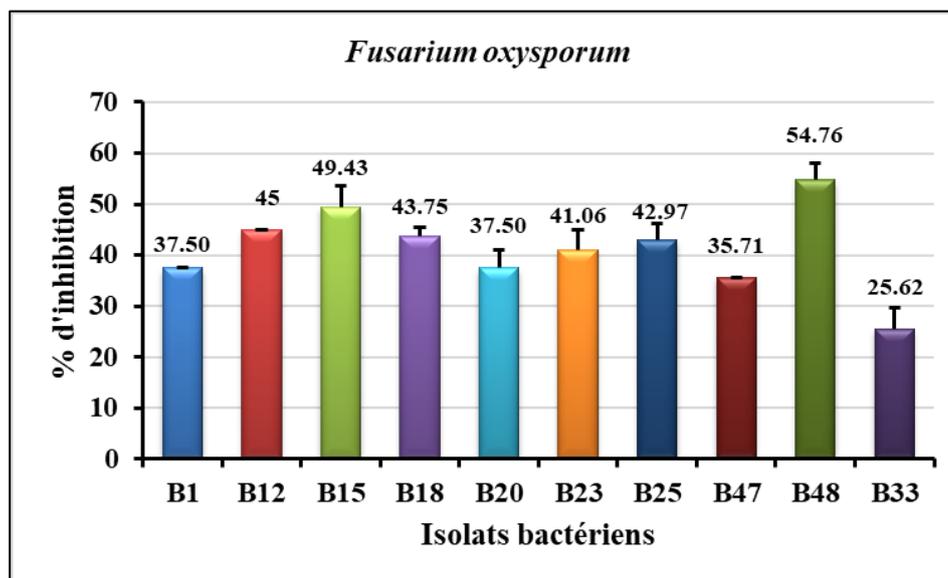


Figure 20 : Pourcentage d'inhibition de *Fusarium oxysporum* par les isolats rhizosphériques.

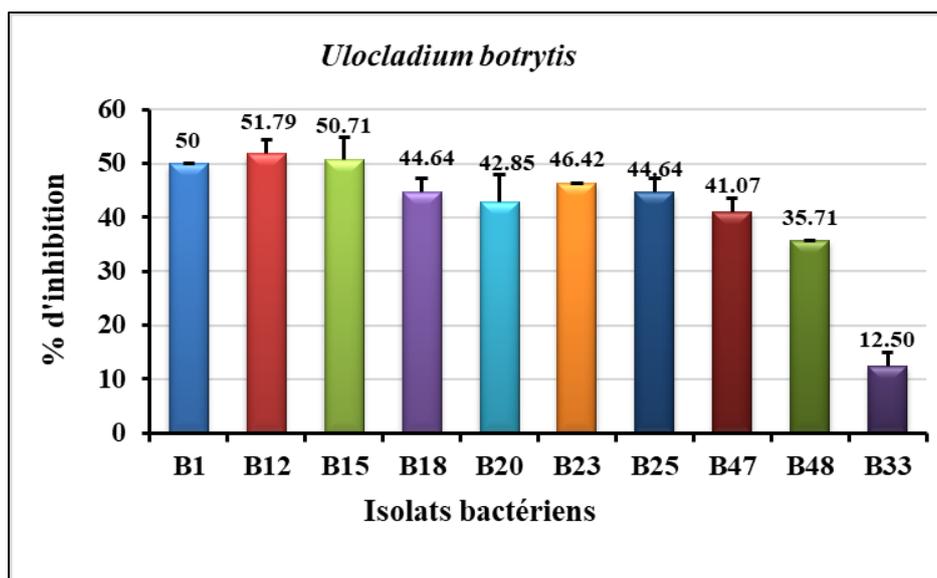


Figure 21 : Pourcentage d'inhibition d'*Ulocladium botrytis* par les isolats rhizosphériques.

Les isolats B15 et B23 ont montré une activité significative contre *Alternaria alternata*, avec des PIC supérieurs à 65% et 70% respectivement. Ensuite, en ce qui concerne *Ulocladium botrytis*, l'activité était modérée, avec des PIC de 50,71% pour l'isolat B15 et de 46,42% pour l'isolat B23. Pour le champignon *Fusarium oxysporum*, les PIC indiquent également une activité moyenne, avec des valeurs de 49,43% et 41,06% respectivement pour les isolats B15 et B23. L'isolat B47 a montré une inhibition moyenne de la croissance mycélienne des champignons *F. oxysporum* et *U. botrytis*, avec un pourcentage d'inhibition de la croissance supérieur à 35%. Cependant, cet isolat a révélé une faible activité antagoniste contre *A. alternata*, avec un PIC de 12,34% (**figure 19,20,21**).

Une activité spécifique contre *F. oxysporum* a été observée avec l'isolat B48, présentant un pourcentage d'inhibition de la croissance de 54,76%. Une activité moyenne, avec un PIC supérieur à 35%, a été enregistrée pour les deux autres champignons. L'isolat B12 a manifesté la plus forte inhibition (51,79%) contre le champignon *U. botrytis*. Pour les champignons *A. alternata* et *F. oxysporum*, des PIC de 46,18% et 45% respectivement ont été enregistrés. Concernant l'isolat B1, une forte activité a été constatée contre *U. botrytis*, avec un PIC de 50%, tandis que pour les deux autres champignons, le pourcentage d'activité était supérieur à 37% (**figure 19,20,21**).

En ce qui concerne l'isolat B33, une activité plus faible a été observée, avec des pourcentages d'inhibition de la croissance variant entre 12% et 30% contre les trois champignons. L'isolat B25 a montré une activité modérée contre *F. oxysporum* (42,97%) et *U. botrytis* (44,64%), mais une activité plus faible contre *A. alternata*, avec un PIC de

21,46%. Enfin, les isolats B18 et B20 ont présenté des pourcentages moyens d'inhibition compris entre 37% et 45% pour les trois champignons phytopathogènes (**figure 19,20,21**).

Cette variation des taux d'inhibition des champignons tests par l'action des isolats antagonistes pourrait être liée à la composition des métabolites secondaires sécrétés, qui varient selon la souche productrice, ainsi qu'aux conditions de production de ces métabolites fongiques. L'activité antifongique a été largement documentée dans de nombreuses recherches (**Clémentine et al., 2019 ; Daoudi et al., 2017 ; Tiendrebeogo et al., 2017 ; Tia et al., 2023**), Dans notre étude, nous avons évalué l'activité antifongique de dix souches de *Bacillus* spp. contre trois espèces fongiques. Tous les isolats testés ont montré une action inhibitrice contre les espèces pathogènes. Par ailleurs, nos résultats corroborent ceux d'autres chercheurs algériens, qui ont montré l'effet in vitro et/ou in vivo de certaines espèces de *Pseudomonas* (**Rai et al., 2016; Bensidhom et al., 2016**), *Bacillus* (**Ait Kaki et al., 2017; Bouaoud et al., 2018**), et *Serratia* (**Tabli et al., 2018**) contre divers champignons phytopathogènes.

Dans leur étude de **2015**, **Das et al.** ont rapporté que des isolats bactériens ont inhibé la croissance des champignons *A. niger*, *A. flavipes* et *Fusarium* sp. Cette inhibition résulte de la production de substances antifongiques dans le milieu de culture. **Chaves-Lopez et al., (2015)**, ont observé que les espèces *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens* et *Bacillus cereus* se distinguent comme principaux producteurs de substances volatiles antifongiques.

Les isolats étudiés dans ce travail proviennent de la zone rhizosphérique, connue pour le potentiel antifongique de ses rhizobactéries. De plus, des études ultérieures menées par **Gargouri-Kammoun et al., (2016)**, ont confirmé que les *Bacillus* spp. produisent des substances volatiles exerçant un effet inhibiteur sur la croissance de *Fusarium* sp. lors le traitement de l'avocat, les céréales, la betterave sucrière, le pois chiche, le soja, le haricot, le coton, les petits pois, les arachides, la pomme de terre, le piment, la tomate, la pomme, la poire et autres.

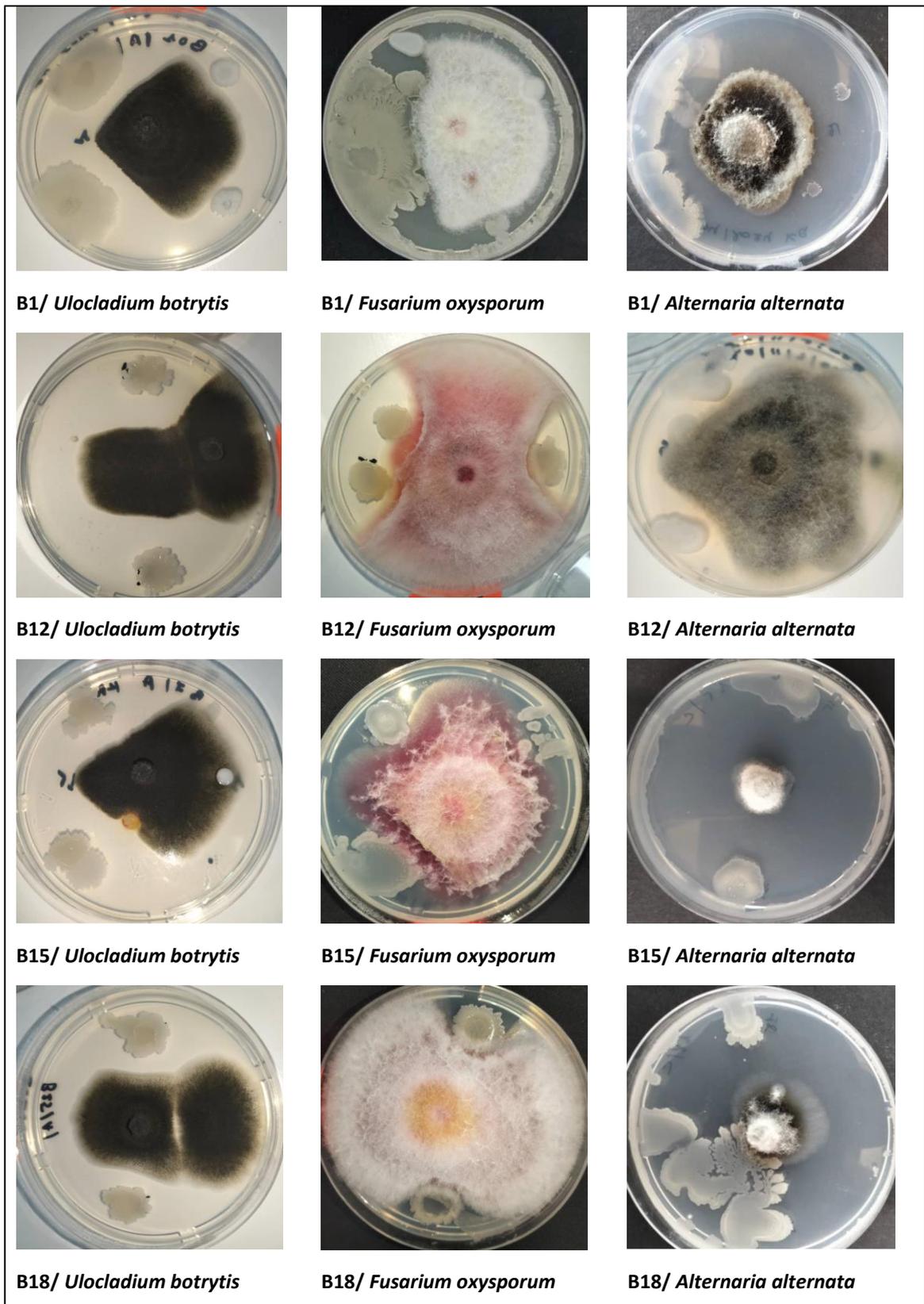


Figure 22 : Exemples de quelques isolats actifs contre les champignons phytopathogènes



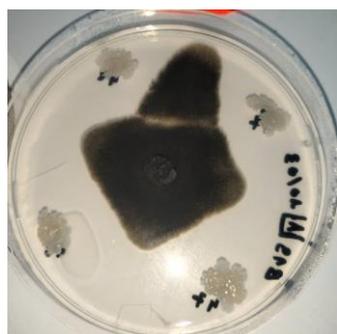
B23/ *Ulocladium botrytis*



B23/ *Fusarium oxysporum*



B23/ *Alternaria alternata*



B48/ *Ulocladium botrytis*



B48/ *Fusarium oxysporum*



B48/ *Alternaria alternata*



B25/ *Ulocladium botrytis*



B25/ *Fusarium oxysporum*



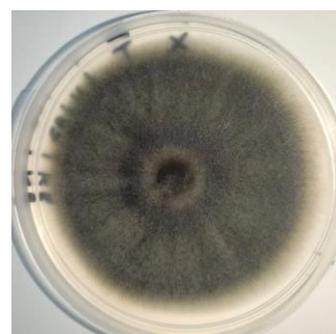
B25/ *Alternaria alternata*



Témnoin : *Ulocladium botrytis*



Témnoin : *Fusarium oxysporum*



Témnoin : *Alternaria alternata*

Figure 22 (suite) : Exemples de quelques isolats actifs contre les champignons phytopathogènes.

III.6 Dépistage Activité antibactérienne contre les bactéries pathogènes

Les souches bactériennes ont été dépistées pour leur pouvoir antibactérien en utilisant la technique de double couche. Les isolats bactériens ont montré une activité antibactérienne plus ou moins importante, les zones d'inhibitions contre les trois colonies des bactéries pathogènes *E. coli*, *S. aureus* et *M. luteus*, ont été mesurées après 24 heures d'incubation et les moyennes de celles-ci figurent dans le graphique ci-dessus.

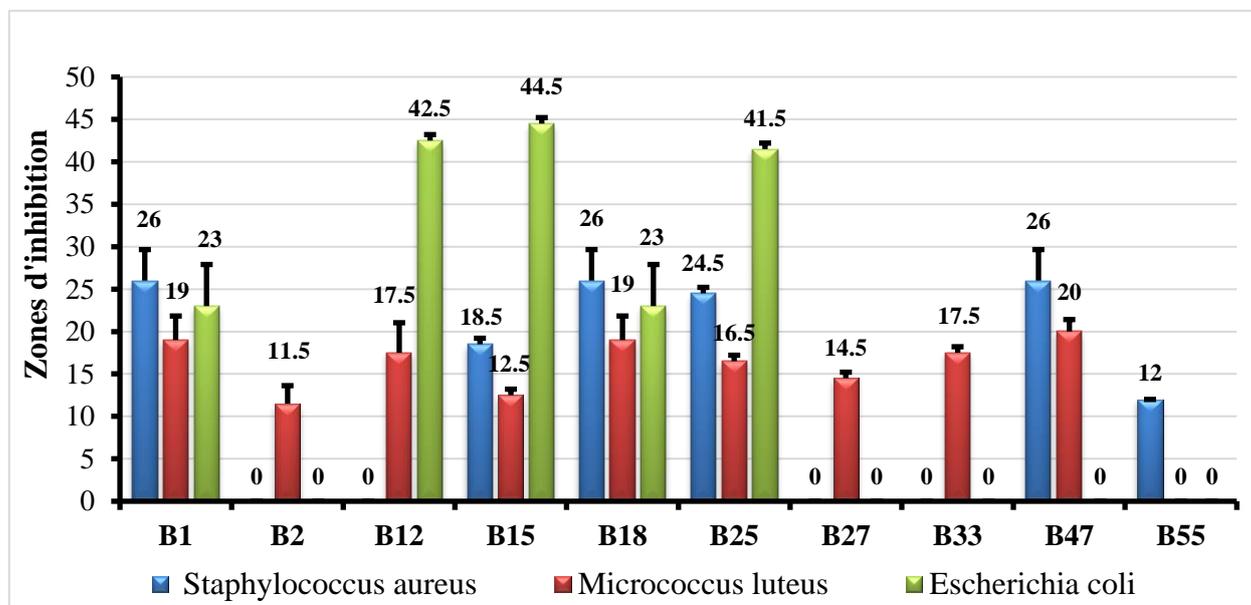


Figure 23 : Zones d'inhibition obtenues par les isolats les plus actifs contre les bactéries pathogènes.

Les isolats bactériens ont été testés contre les bactéries pathogènes à Gram positif *S. aureus* et *M. luteus*, ainsi que la bactérie à Gram négatif *E. coli*. L'isolat B55 a présenté une activité spécifique contre *S. aureus* avec une zone d'inhibition de 12mm. En comparaison, les isolats B1, B15, B18 et B25 ont tous présenté une activité inhibitrice contre les trois bactéries. Pour l'isolat B2, B27 et B33 ont montré une forte activité contre *M. luteus*, avec des zones d'inhibition de 11,5mm, 14,5mm et 17,5mm respectivement, comparativement aux isolats B12 et B47. L'isolat B12 a enregistré une valeur d'inhibition de 17,5mm contre *M. luteus* et 42,5mm contre *E. coli*. En revanche, l'isolat B47 a montré des zones d'inhibition de 26mm contre *S. aureus*, 20mm contre *M. luteus*, mais aucune activité contre *E. coli*. La meilleure activité a été enregistrée chez B15 contre *E. coli*, tandis que l'isolat B2 a montré une activité faible contre *M. luteus* et aucune activité contre les deux autres bactéries.

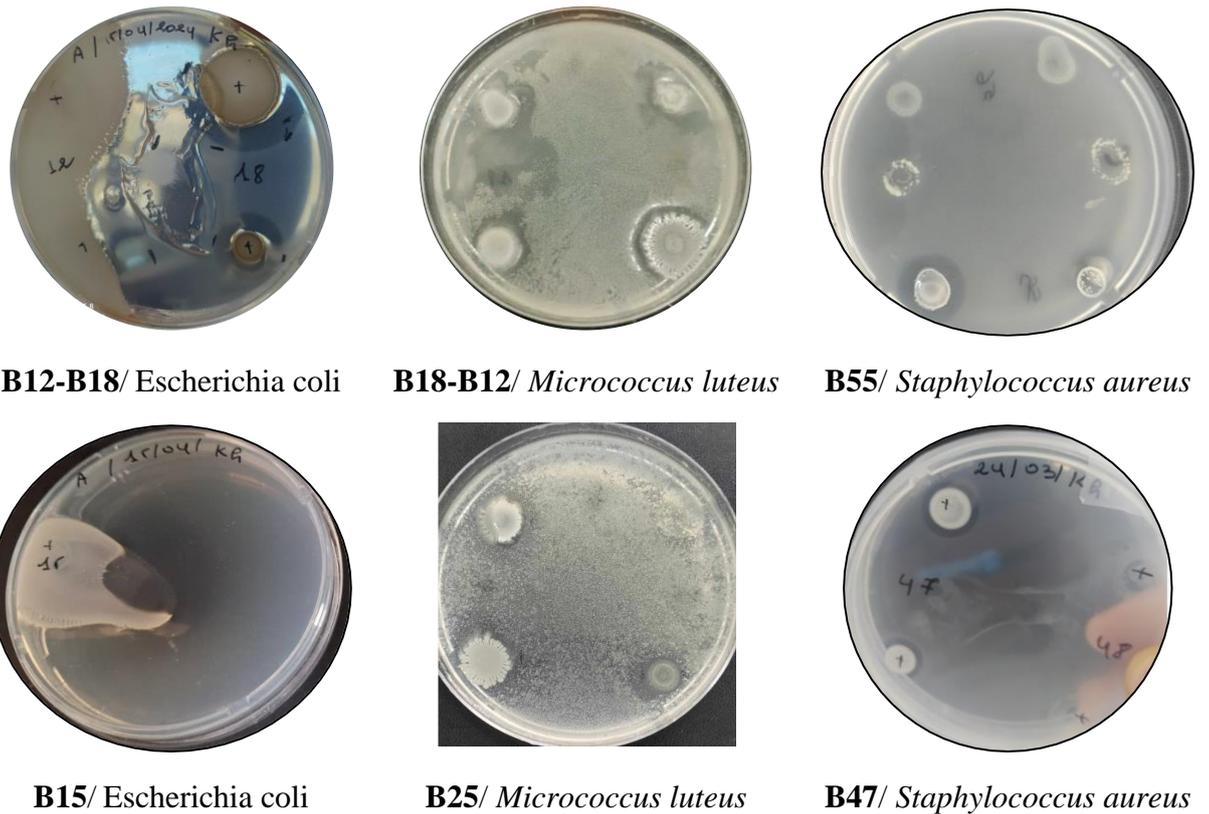


Figure 24 : quelques isolats actifs contre les bactéries pathogènes.

En effet, l'espèce *Bacillus thuringiensis*, en santé humaine, il permet de contrôler efficacement les populations de plusieurs diptères vecteurs de maladies (**Robbee et al., 2019**).

III.7 Activité antimicrobienne des filtrats

L'efficacité antibactérienne des filtrats contre les trois champignons phytopathogènes a été mesurée en termes de diamètre de la zone d'inhibition entourant les puits contenant les filtrats. Chaque zone transparente témoigne de l'éradication des champignons phytopathogènes, ce qui offre une indication nette de l'efficacité antibactérienne du filtrat employé. Les résultats obtenus sont récapitulés dans le tableau II.

Tableau II : Activité antifongique des filtrats des isolats bactériens.

Isolats bactériens	Zones inhibition (mm)		
	<i>Alternaria alternata</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Ulocladium botrytis</i>
B1	32.5±2	00±00	12±1.5
B12	34±0.5	00±00	00±00
B15	25.5±2	00±00	17.25±6.75
B18	10.5±0	00±00	00±00
B23	20.5±2.5	00±00	00±00
B48	23.75±0.25	00±00	22.25±2.25
B20	00±00	00±00	00±00
B25	00±00	00±00	00±00
B47	00±00	00±00	00±00
B33	00±00	00±00	00±00

Parmi les dix échantillons des filtrats bactériens analysés, seuls six ont montré une activité antifongique contre les champignons *A. alternata* et *U. botrytis*, tandis qu'aucun n'a été efficace contre le *F. oxysporum*. Les filtres bactériens B12, B18 et B23 ont présenté une inhibition uniquement contre *A. alternata*, avec des zones d'inhibition variant de 10.5 ± 0 à 34 ± 0.5 . Les filtrats B1, B15 et B48 ont montré une activité contre *A. alternata* (32.5 ± 2 , 25.5 ± 2 , 23.75 ± 0.25) et *U. botrytis* (12 ± 1.5 , 17.25 ± 6.75 , 22.25 ± 2.25) respectivement, mais aucune activité n'a été observée contre *F. oxysporum*. Les filtrats bactériens B20, B25, B47 et B33 n'ont présenté aucune activité contre les trois champignons phytopathogènes. Aucune activité antibactérienne n'a été détectée lors des tests des filtres bactériens contre les bactéries pathogènes.

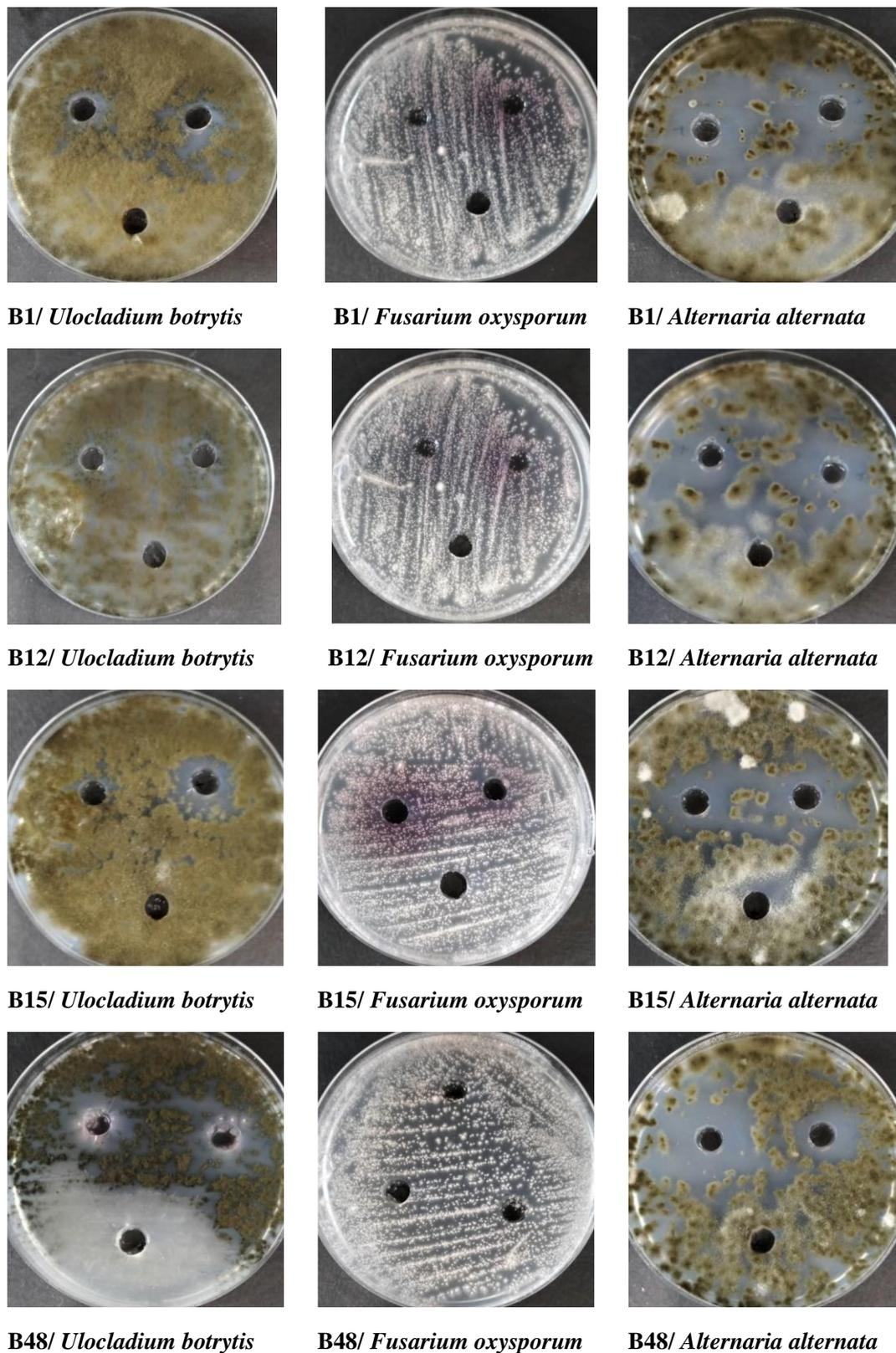


Figure 25 : Activité antifongique des filtrats obtenues par la méthode des puits.

Selon **Djellout et al., (2019)**, l'absence d'activité antibactérienne ou antifongique ne signifie pas nécessairement que la substance est absente ou inactive, mais peut être due à une mauvaise diffusion dans le milieu, en raison de sa nature non polaire. Des études antérieures de **Mougou et Boughalleb-M'hamdi (2018)**, ont montré que divers genres de bactéries, notamment *Bacillus*, sont producteurs d'antibiotiques et d'enzymes hydrolytiques. En fait, les espèces de *Bacillus* produisent des métabolites secondaires tels que des antibiotiques, des enzymes lytiques, ainsi que des composés volatils et non volatils. Ces bactéries jouent un rôle crucial dans la résistance aux organismes phytopathogènes grâce à la production d'antibiotiques antimicrobiens, de toxines, d'hydrolases et de lipopeptides.

De nombreux rapports récents sur les métabolites secondaires microbiens (**Zothanpuia et al., 2018 ; Overy et al., 2019**), ont mis en évidence leur potentiel pour la santé humaine et animale. Ces composés, incluant des antibiotiques, des pigments, des hormones de croissance et des agents antitumoraux, bien que non essentiels à la croissance microbienne, montrent un grand potentiel bénéfique. Ils sont généralement produits lors de la phase de croissance tardive des micro-organismes producteurs (**Singh et al., 2019**).

Les recherches de **Milet, (2017)**, ont montré que *Bacillus* spp. peut inhiber la croissance du mycélium pathogène *Alternaria* sp. Jusqu'à 50%, notamment *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis*, *B. pumilus* et *B. subtilis*. Cette inhibition permet de maintenir la maladie à un seuil acceptable. Les essais de lutte biologique avec ces souches ont montré leur efficacité à limiter l'incidence de *Fusarium* et d'*Alternaria*. Un des mécanismes d'action, qui ne peut s'exprimer in vitro, est la stimulation de la résistance des plantes par l'activation des mécanismes de défense, comme l'épaississement de la paroi cellulaire (**Elnahal et al., 2022**). Par exemple, pour prévenir la plasmolyse après une infection par *Fusarium graminearum*, une souche de *Bacillus velezensis* a induit l'épaississement de la paroi cellulaire des plantes autour du site d'infection (**Cantoro et al., 2021**).

Les genres bactériens étudiés, notamment *Bacillus*, sont également connus pour leur pouvoir de biocontrôle contre divers champignons phytopathogènes comme *B. cinerea* (**Calvo et al., 2020**), *A. alternata* (**Gorai et al., 2021**), Nos tests in vitro ont montré que la croissance mycélienne d'*A. alternata* et d'*U. botrytis* est significativement inhibée par les isolats B1, B15 et B48. Ces résultats concordent avec plusieurs études qui ont rapporté l'effet antagoniste des espèces de *Bacillus* (**You et al., 2021**), et d'*Acinetobacter* (**Faria et al., 2021**), contre divers champignons phytopathogènes. De plus, ces bactéries sont connues pour produire des composés antifongiques diffusibles et

volatils (You et al., 2021), et stimulent également les défenses des plantes contre de nombreuses maladies cryptogamiques. Alamri et al. (2019), ont montré que *B. subtilis* HQ656002 peut induire des mécanismes de défense de la laitue contre la pourriture des racines causée par *Exserohilum rostratum* et *Fusarium oxysporum*, notamment par l'activation de gènes de « défensine » en présence de cette bactérie. Les résultats obtenus dans cette étude suggèrent qu'à l'avenir, il serait possible d'utiliser des produits à base de *Bacillus thuringiensis* et *Bacillus cereus* pour élaborer des fongicides et des produits phytosanitaires biologiques respectueux de l'environnement, réduisant ainsi l'utilisation de produits chimiques dans le cadre d'une lutte biologique.

III.8 Activité enzymatique

Le test préliminaire de l'activité antifongique sur les 48 isolats a permis de sélectionner les 10 isolats suivants : B1, B12, B15, B18, B20, B23, B25, B33, B47 et B48, qui ont fait l'objet des tests ultérieurs. Différentes activités enzymatiques ont été recherchées sur milieux gélosés, à savoir la protéase, la cellulase et l'amylase. Les résultats varient entre nuls, faibles, moyens et bons selon les isolats. L'activité enzymatique a été quantifiée par la mesure des diamètres des colonies et des zones formées autour des coloniesensemencées par spots sur la surface des milieux de culture. Ce paramètre permet de calculer l'index de l'activité enzymatique (IE).

Les résultats du test de l'activité cellulosique réalisé dans cette étude ont révélé que 9 isolats de *Bacillus* sp. sur les 10 testés ont présenté des résultats positifs, à l'exception de l'isola B33. Cette activité a été observée chez les isolats B1, B15, B20, B25 et B47, avec des IE compris entre 2,45 et 3,70. L'isolat B18, B12, B48 et B23 ont montré l'activité cellulosique la plus élevée, avec des IE de 6,67, 5,83, 5,25 et ,4,10 respectivement. En revanche, l'isolat B33 n'a montré aucune activité cellulosique. Le reste des isolats ont présenté une activité comprise entre 2,45 et 3,70 (**figure 27**).

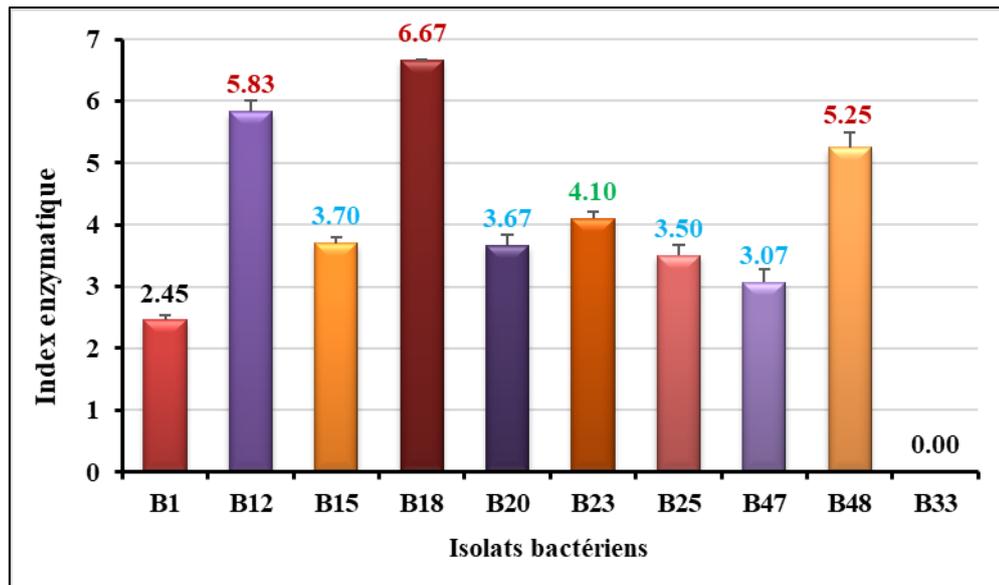


Figure 26 : Index enzymatique de l'activité cellulolytiques des isolats les plus actifs.

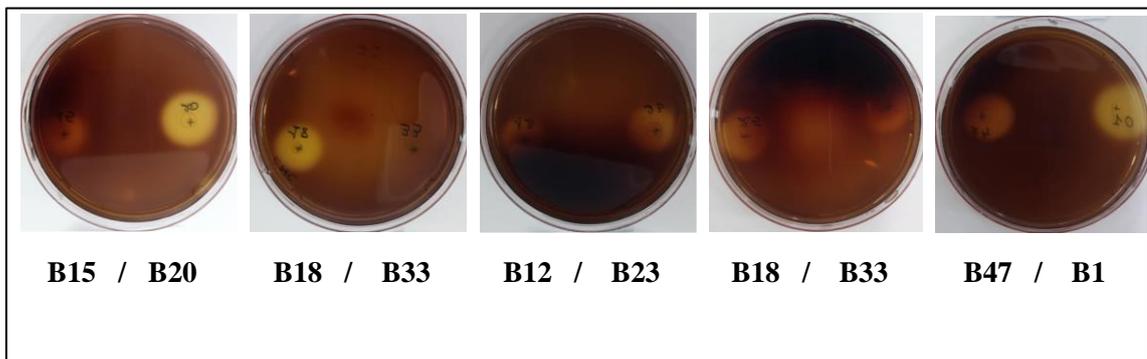


Figure 27 : Activité cellulolytiques des isolats les plus actifs.

Pour l'activité protéolytique, les résultats positifs observés chez les isolats se manifestent par une zone claire et transparente entourant les colonies, indiquant l'utilisation des protéines présentes dans le lait comme source de carbone et d'énergie. Dans cette étude, 60 % des isolats se sont révélés producteurs d'enzymes protéolytiques. Les isolats B15 et B23 ont enregistré les IE les plus élevés, avec respectivement 2,06 et 2,90. En comparaison, les IE des isolats B1, B12, B18, B20 et B47 sont moyens, avec des valeurs comprises entre 1,18 et 1,47. L'isolat B48 a montré l'IE le plus faible, avec une valeur de 0,62. En outre, les isolats B25 et B33 n'ont montré aucune activité (**figure 28**). En ce qui concerne l'activité amylolytique, tous les isolats ont présenté des résultats négatifs.

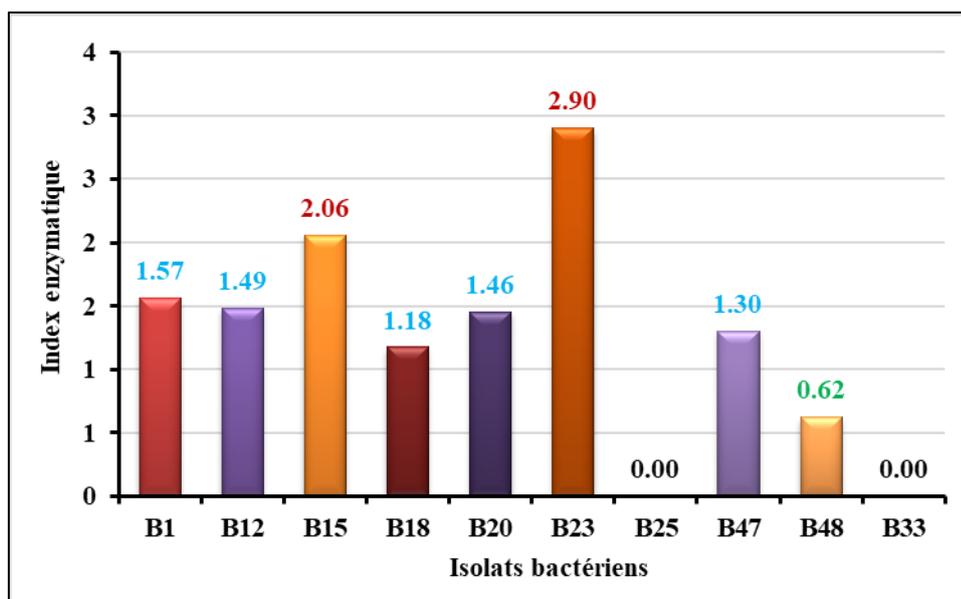


Figure 28 : Index enzymatique de l'activité protéolytique des isolats les plus actifs.

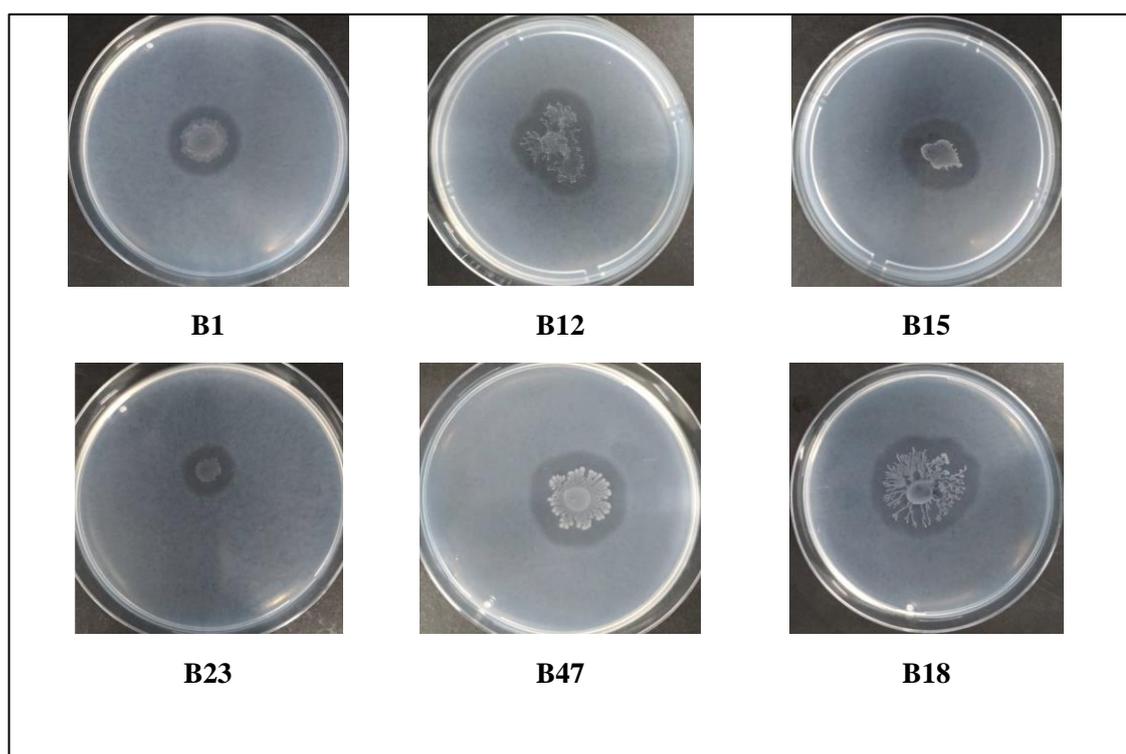


Figure 29 : Activité protéolytique des isolats les plus actifs.

Les résultats des tests enzymatiques réalisés dans cette étude ont révélé que parmi les 10 isolats de *Bacillus* sp. utilisés, tous, à l'exception de la souche B33, ont présenté une activité positive pour la cellulase. De plus, 8 isolats de *Bacillus* sp. ont montré une activité positive pour l'activité protéolytique, à l'exception des souches B25 et B33. En revanche, aucune activité enzymatique n'a été observée pour l'amylase. Nos résultats diffèrent de ceux

obtenus par **Nabti et al., (2014)**, **Ahmad et al., (2013)**, et **Dinesh et al., (2015)**, où 25 % des isolats étaient positifs pour la cellulase.

La production d'une enzyme par les micro-organismes est déterminée en fonction de leur capacité à décomposer un substrat et à modifier la couleur du milieu de culture spécifique autour des colonies (**Khanh et al., 2020**). Les enzymes jouent également un rôle crucial dans la bio-fertilisation des sols en dégradant la matière organique. Des enzymes telles que les protéases, les lipases, les amylases, les chitinases et les uréases sont souvent recherchées comme critères de sélection pour des PGPR efficaces (**Rai et al., 2018**).

D'après **Hakim et al., (2021)**, la sécrétion et la production d'enzymes lytiques sont les principales caractéristiques des agents de lutte biologique pour prévenir le développement de microbes pathogènes, les PGPR produisent différents enzymes lytiques telles que la déshydrogénase, les chitinases, la b-glucanase, protéases, phosphatases, lipases, cellulases. Les enzymes variées produites par ces *Bacillus* (amylase, protéase, glucanase, etc.) sont employées dans divers procédés industriels, y compris les détergents (protéase alcaline), la cuisson (amylase) et les boissons (amylase, glucanase). Les enzymes diverses produites par ces souches de *Bacillus* (telles que l'amylase, la protéase, la glucanase, etc.) sont utilisées dans différents procédés industriels, notamment la fabrication de détergents (protéase alcaline), la transformation alimentaire (amylase) et la production de boissons (amylase, glucanase).

Ahemad et al., (2014); **Reetha et al., (2014)**, ont souligné que la majorité des espèces cellulolytiques appartiennent aux genres *Bacillus* et *Pseudomonas*. Ces bactéries utilisent la cellulase pour dégrader la cellulose présente dans les parois cellulaires des champignons phytopathogènes. Dans le domaine de l'agriculture, les cellulases sécrétées par certains *Bacillus* spp. ont été identifiées comme un élément favorisant la croissance des plantes (**Ajigbola et al., 2013**). Les études menées par **Fouda et al., (2024)** ont confirmé que les cellulases produites par des bactéries thermotolérantes présentent un fort potentiel. L'utilisation de bactéries thermophiles telles que *Bacillus* spp. pour la production de cellulase comporte de nombreux avantages. Ces bactéries ont la capacité de sécréter des cellulases très efficaces et stables, même à des températures élevées, ce qui les rend particulièrement intéressantes pour la synthèse de ces enzymes. Les protéases peuvent être produites par des bactéries, des moisissures et des levures. Parmi les protéases d'origine bactérienne, la subtilase est principalement produite par *Bacillus subtilis* et certains genres apparentés (**Boudehane et Mezioud, 2017**).

Environ 70% des isolats obtenus produisent des protéases ; actuellement, une grande proportion de protéases disponibles commercialement sont obtenues à partir de souches de *Bacillus*. Espèces de *Bacillus* impliquées dans la protéase. La production comprend *B. megaterium*, *B. cereus*, *B. stearothermophilus*, *B. mojavensis* et *B. subtilis*. Les microbes de divers habitats ont été examinés par de nombreux chercheurs pour obtenir des protéases industriellement adaptées (**Ayantunji et al., 2020**). Les protéases extracellulaires produites par certains agents de lutte biologique peuvent dégrader la paroi des champignons phytopathogènes. Cela suggère une relation possible entre l'inhibition de la croissance des champignons pathogènes et la synthèse de ces protéases par les huit souches de *Bacillus* sp. Le rôle de ces enzymes dans la protection des plantes contre les champignons phytopathogènes a été montré par plusieurs auteurs pour d'autres agents de lutte biologique, tels que les actinomycètes (**Gopalakrishnan et al., 2014**) et les *Bacillus* (**Masciarelli et al., 2014**).

Pour l'activité amylolytique, cette étude a révélé une absence totale de production d'amylase (0 %) chez les isolats de *Bacillus* sp. isolés de la rhizosphère de *Globularia alypum*. Les résultats obtenus par **Gontia-Mishra et al., (2016)**, sont également négatifs pour ce test, ce qui concorde avec nos observations. En revanche, nos résultats diffèrent de ceux de **Dinesh et al.,(2015)**, qui ont constaté que 25 % des souches présentaient une activité amylolytique. Ces variations peuvent être expliquées par la diversité des sites de prélèvement ainsi que par la diversité génétique des isolats.

Conclusion et perspectives

Conclusion et perspectives

La lutte biologique utilisant les rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes (PGPR) est une méthode prometteuse pour améliorer la production végétale et gérer les champignons phytopathogènes. Le principal objectif de ce travail était d'évaluer l'efficacité des agents antagonistes appartenant à l'espèce *Bacillus* sp. vis-à-vis des champignons phytopathogènes et des bactéries pathogènes. L'étude a débuté par l'isolement des souches bactériennes du genre *Bacillus* à partir de la rhizosphère de la plante *Globularia alypum*. Par la suite, des souches fongiques ont été isolées à partir de la tomate et du blé dur.

Les résultats des examens macroscopiques et microscopiques des champignons de tomate et de blé dur ont révélé la présence de trois espèces fongiques différentes : *Alternaria alternata* et *Fusarium oxysporum* pour la tomate, et *Ulocladium botrytis* pour le blé dur. L'activité antagoniste des souches bactériennes contre ces champignons a été étudiée selon la méthode de double culture sur le milieu PDA, montrant des pourcentages d'inhibition variables. Certaines souches présentaient une efficacité très élevée, tandis que d'autres étaient moyennement efficaces ou montraient une efficacité faible voire nulle contre les champignons phytopathogènes.

Après ces étapes, les souches les plus actives ont été sélectionnées (10 isolats). Les taux d'inhibition étaient particulièrement élevés contre le champignon *U. botrytis*. L'isolat B23 montrait une inhibition très élevée contre *A. alternata*, tandis que B48 était particulièrement efficace contre *F. oxysporum*. Les isolats B12, B15, B18, B23 et B40 ont montré une activité moyenne, mais une faible activité a été enregistrée contre *F. oxysporum* pour les isolats B1, B20 et B47.

L'activité des isolats bactériens contre le champignon *U. botrytis* a été classée selon les critères d'activité forte (B1, B12, B15), moyenne (B18, B20, B23, B25, B47, B48) et faible (B33). Simultanément, les dix isolats ont été testés contre trois bactéries pathogènes selon la méthode de double couche, montrant des niveaux d'activité variés. La souche B15 était particulièrement efficace contre *E. coli*, tandis que B47 montrait une forte activité contre *M. latus* et la souche B55 contre *S. aureus*.

Le test antimicrobien du filtrat sur le milieu PDA a révélé que certaines isolats (B1, B15, B18, B48) possédaient un pouvoir inhibiteur contre *A. alternata* et *U. botrytis*, tandis que d'autres (B12, B18, B23) inhibaient seulement *A. alternata*. Aucun pouvoir inhibiteur n'a été détecté contre *F. oxysporum*.

Les isolats rhizosphériques testés présentaient des activités enzymatiques variées. La plupart des souches sélectionnées produisaient des enzymes dégradant les parois cellulaires

(cellulase et protéase), à l'exception des isolats B25 et B33. Les isolats B18, B12, B48 et B23 montraient une activité cellulosique la plus élevée. Concernant l'activité protéolytique, les isolats B15, B20, B25, B47 et B1 avaient une activité moyenne. En revanche, tous les isolats ont montré des résultats négatifs pour l'activité amylolytique.

En conclusion, cette étude a indiqué que les isolats sélectionnés, notamment B12 et B15, pourraient être exploités comme agents de lutte biologique grâce à la production de substances antifongiques à large spectre. En plus de leur rôle dans le biocontrôle, ces isolats peuvent stimuler et améliorer la croissance des plantes en agissant comme bio-stimulateurs et biofertilisants.

Cette recherche ouvre plusieurs perspectives, notamment :

- Tester l'activité des isolats sur d'autres champignons et bactéries ;
- Réaliser des tests d'inoculation *in vivo* (sur plantes), *in vitro* et sur champs pour évaluer leur effet sur la promotion de la croissance des plantes ;
- Procéder à l'identification phylogénétique des isolats ;
- Purifier, identifier et caractériser biochimiquement les molécules antifongiques produites ;
- Étudier les mécanismes d'action de ces agents antagonistes ;

Références bibliographiques

Références bibliographiques

Abdel-Wahab N. M., El-kashef D. F., Attia E. Z., Desoukey S. Y., Elkhayat E. S., Fouad M. A., & Kamel M. S. (2018). Total phenol content and antioxidant activities of the fungus *Ulocladium botrytis*. *Journal of advanced Biomedical and Pharmaceutical Sciences* 1(1), 17-19.

Achetbi H., Amiri S., & Lahlali R. (2021). Les Alternarioses (*Alternaria* spp.) des agrumes : Diagnostic et méthodes de lutte. *Revue Marocaine des Sciences Agronomiques et Vétérinaires* 9(2), 158-169.

Ahemad M. & Kibret M. (2014). Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: current perspective. *Journal of King saud University-science* 26(1), 1-20.

Ahmad N., Shinwari Z. K., Bashir S. & Yasir M. (2013). Function and pylogenetic characterization of rhizospheric bacteria associated with GM and non GM maize. *Pakistan Journal of Botany* 45(5), 1781-1788.

Ait Kaki A., Kacem Chaouche N., Dehimat L., Milet A., Youcef-Ali M., Ongena M. & Thonart P. (2013). Biocontrol and plant growth promotion characterization of *Bacillus* species isolated from *Calendula officinalis* rhizosphere. *Indian journal of microbiology* 53, 447-452.

Ajilogba C. F. & Babalola O. O. (2013). Integrated management strategies for tomato *Fusarium* wilt. *Biocontrol science* 18(3), 117-127.

Alamri S. A., Hashem M., Mostafa Y. S., Nafady N. A. & Abo-Elyousr K. A. (2019). Biological control of root rot in lettuce caused by *Exserohilum rostratum* and *Fusarium oxysporum* via induction of the defense mechanism. *Biological Control* 128, 76-84.

Al-Askar A. A., Ghoneem K. M., Rashad Y. M., Abdulkhair W. M., Hafez E. E., Shabana Y. M. & Baka, Z. A. (2014). Occurrence and distribution of tomato seed-borne mycoflora in Saudi Arabia and its correlation with the climatic variables. *Microbial biotechnology* 7(6), 556-569.

Ali M. A., Ren H., Ahmed T., Luo J., An Q., Qi X. & Li, B. (2020). Antifungal effects of rhizospheric *Bacillus* species against bayberry twig blight pathogen *Pestalotiopsis versicolor*. *Agronomy* 10(11), 1811.

Askun T. (2018). Introductory chapter: *Fusarium*: pathogenicity, infections, diseases, mycotoxins and management. *Fusarium: Plant Diseases, Pathogen Diversity, Genetic Diversity, Resistance and Molecular Markers*, 1

AYAD D. (2019). Recherche sur les agents responsables de l'Alternariose de la pomme de terre et de la tomate en Algérie. Thèse de doctorat, École Nationale Supérieure Agronomique Alger.

Ayantunji Y. J., Omole R. K., Olojo F. O. & Awojobi K. O. (2020). Optimization of alkaline protease production in submerged fermentation using *Bacillus cereus* isolated from an abattoir wastewater in Ile-Ife, Nigeria. *Journal of Advances in Biology & Biotechnology* 23(3), 1-15.

Babadoost M. (2018). Secondary chapter: *Fusarium*: Historical and continued importance. *Fusarium: Plant Diseases, Pathogen Diversity, Genetic Diversity, Resistance and Molecular Markers*, 13-24.

Baptista J. P., Teixeira G. M., De Jesus M. L. A., Bertê R., Higashi A., Mosela M., de Oliveira, A. G., Sanches D. S., Brancher J. D., Balbi-Pena M. I., De Padua Pereira U. & De Oliveira A. G. (2022). Antifungal activity and genomic characterization of the biocontrol agent *Bacillus velezensis* CMRP 4489. *Scientific Reports* 12(1), 17401.

Bensidhoum L., Nabti E., Tabli N., Kupferschmied P., Weiss A., Rothballer M., Schmid M. & Hartmann A. (2016). Heavy metal tolerant *Pseudomonas protegens* isolates from agricultural well water in

northeastern Algeria with plant growth promoting, insecticidal and antifungal activities. *European Journal of Soil Biology* 75, 38-46.

Benzohra I. E., Mégateli M., Belaidi H. & Toumi-Benali F. (2019). Activité antifongique de l'extrait méthanolique de R'tem (*Retama raetam*) sur la croissance mycélienne et la sporulation de *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*, agent de Bayoud du Palmier dattier. *Journal Algérien des Régions Arides* (JARA) 13(2), 01-11.

Bouaoud Y., Troulet C., Foughalia A., Berge O., Aissat K. & Bardin M. (2018). A multi-criteria approach for the selection of efficient biocontrol agents against *Botrytis cinerea* on tomato in Algeria. *BioControl* 63, 299-311.

Boudehane A. & Mezioud R. (2017). Caractérisation physico-chimique d'enzymes bactériennes d'intérêt industriels et thérapeutiques. Mémoire de master, Université de Bouira.

Bouhamed R., Bouamra, A., & Boukra Z. (2021). Intérêt d'un Service des maladies Infectieuses et un service d'épidémiologie au CHU de Blida. *Journal de la faculté de médecine de Blida*, 58-59.

Calvo H., Mendiara I., Arias E., Gracia A. P., Blanco D. & Venturini, M. E. (2020). Antifungal activity of the volatile organic compounds produced by *Bacillus velezensis* strains against postharvest fungal pathogens. *Postharvest Biology and Technology* 166, 111208.

Cantoro R., Palazzini J. M., Yerkovich N., Miralles D. J. & Chulze S. N. (2021). *Bacillus velezensis* RC 218 as a biocontrol agent against *Fusarium graminearum*: effect on penetration, growth and TRI5 expression in wheat spikes. *BioControl* 66, 259-270.

Chaves-López C., Serio A., Gianotti A., Sacchetti G., Ndagijimana M., Ciccarone C., Stellarini A., Corsetti A. & Paparella A. (2015). Diversity of food-borne *Bacillus* volatile compounds and influence on fungal growth. *Journal of Applied Microbiology* 119(2), 487-499.

Clémentine K. K. A., Mesmin K. Y., Honora D. T. B. F. & Kablan, T. (2017). Activité Antifongique In Vitro des Extraits de Cinq Plantes Locales sur *Colletotrichum higginsianum*, *Fusarium oxysporum* et *Rhizopus stolonifer*, Agents Pathogènes de la Papaye (*Carica papaya* L.) et de la Tomate (*Solanum lycopersicum* L.) *European Scientific Journal* 15(9), 1857 – 7881.

Cox N. A., Richardson L. J., Cosby D. E., Berrang M. E., Wilson J. L. & Harrison M. A. (2016). A four-quadrant sequential streak technique to evaluate *Campylobacter* selective broths for suppressing background flora in broiler carcass rinses. *Journal of Food Safety* 37(2), e12311.

Daoudi A., Bammou M., Haloui Z., Ibjibjen J., Nassiri L. (2017). Activite Antifongique Des Extraits Aqueux De *Calendula Officinalis* L, *Urginea Maritima* (L.) Baker Et *Chenopodium Ambrosioides* L. Baker et *Chenopodium ambrosioides* L. *European Scientific Journal* 13(24), 483-497.

Das M. P., Devi P. V. & Yasmine, Y. (2015). A study on antagonistic potential of bacteria against phytopathogenic fungi. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research* 34(1), 191-193.

De Mers M. (2022). *Alternaria alternata* as endophyte and pathogen. *Microbiology* 168(3), 001153.

Demeule E. (2020). Effet répressif de *Bacillus subtilis* et de *Bacillus pumilus* envers *Rhizoctonia solani* sur tomate et concombre de serre. mémoire de maîtrise, Université de Québec Canada.

Dinesh R., Anandaraj M., Kumar A., Bini Y. K., Subila 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.

- Djellout H., Mekheldi D., Belkacem K. K., Raio A & Krimi Z. (2019).** Evaluation de potentiel de souche antagoniste de *Bacillus* spp. et de *pseudomonas* spp. Dans le contrôle d'*agrobacterium* spp. Pathogène impliqué dans la maladie de galle de collet. *Revue Agrobiologia* 9(1), 1267-1283.
- Dornelas J. C. M., Figueiredo J. E. F., De Abreu C. S., Lana U. G. P., Oliveira-Paiva C. A. & Marriel I. E. (2017).** Characterization and phylogenetic affiliation of *Actinobacteria* from tropical soils with potential uses for agro-industrial processes. *Genetics and Molecular Research* 16 (3), gmr16039703.
- Dufresne P. & Guy S. G. (2021).** Identification des champignons d'importance médicale. Rapport de stage, Institut National de santé publique Québec Canada, 1-64.
- Elazouni I., Abdel-Aziz S. & Rabea A. (2019).** Microbial efficacy as biological agents for potato enrichment as well as bio-controls against wilt disease caused by *Ralstonia solanacearum*. *World journal of microbiology and biotechnology*, 35, 1-13.
- Elnahal A. S., El-Saadony M. T., Saad A. M., Desoky E. S. M., El-Tahan A. M., Rady M. M., Abuqamar S. F. & 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* 162(4), 759-792.
- Fabre F. (2020).** Déterminisme de la sensibilité du blé tendre à la Fusariose de l'épi. Thèse de doctorat, Université Clermont Auvergne.
- Faria P. S. A., de Oliveira Marques, V., Selari P. J. R. G., Martins P. F., Silva F. G. & de Fátima Sales J. (2021).** Multifunctional potential of endophytic bacteria from *Anacardium othonianum* Rizzini in promoting in vitro and ex vitro plant growth. *Microbiological Research* 242, 126600.
- Fouda A., Alshallash K. S., Atta H. M., El Gamal M. S., Bakry M. M., Alawam A. S. & Salem S. S. (2024).** Synthesis, Optimization, and Characterization of Cellulase Enzyme Obtained from Thermotolerant *Bacillus subtilis* F3: An Insight into Cotton Fabric Polishing Activity. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 34(1), 207.
- Foughalia A. (2022).** Recherche d'agents de lutte biologique d'origine microbienne contre des champignons phytopathogènes. Thèse de doctorat, Université Mohamed Khider de Biskra.
- Friščić M., Petlevski R., Kosalec I., Madunić J., Matulić M., Bucar F., Pilepic K. H. & Males Ž. (2022).** *Globularia alypum* L. and related species: LC-MS profiles and antidiabetic, antioxidant, anti-inflammatory, antibacterial and anticancer potential. *Pharmaceuticals* 15(5), 506.
- Gargouri-kammoun L., Jmii H., Essgair B., Hajlaoui Mohamed R. & Sadfi-Zouaoui N. (2016).** Bio-suppression de la fusariose du Maïs et réduction des mycotoxines DON par des bactéries antagonistes du genre *Bacillus*. *Journal of New Sciences, Agriculture and Biotechnology* (4), 1217-1227.
- Giroux L. (2015).** Caractérisation de rhizobactéries du groupe des *Bacillus* bénéfiques à la croissance de la tomate. Mémoire de maîtrise, Université du Québec à Trois-Rivières Canada.
- Gontia Mishra I., Sapre S., Sharma A. & Tiwari S. (2016).** Amelioration of drought tolerance in wheat by the interaction of plant growth-promoting rhizobacteria. *Plant biology* 18(6), 992-1000.
- Gopalakrishnan S., Srinivas V., Sree Vidya M. & Rathore A. (2013).** Plant growth-promoting activities of *Streptomyces* spp. in sorghum and rice. *SpringerPlus* 2, 1-8.
- Gorai P. S., Ghosh R., Konra S. & Mandal N. C. (2021).** Biological control of early blight disease of potato caused by *Alternaria alternata* EBP3 by an endophytic bacterial strain *Bacillus velezensis* SEB1. *Biological Control* 156, 104551.

- Hajji H., Tallal I., Maafa I., Bentata F., El Alaoui Faris F., Abdennebi E. & El Aissami A. (2016).** In vitro evaluation of the antifungal activity of four Moroccan medicinal plants extracts on five phytopathogenic fungi. *Revue Marocaine de Protection des Plantes* 10, 57-65.
- Hakim S., Naqqash T., Nawaz M. S., Laraib I., Siddique M. J., Zia R., Sajjad Mirza M. & Imran A. (2021).** Rhizosphere engineering with plant growth-promoting microorganisms for agriculture and ecological sustainability. *Frontiers in Sustainable Food Systems* 5, 617157.
- Hasan A., Tabassum B., Hashim M., & Khan N. (2024).** Role of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) as a plant growth enhancer for sustainable agriculture: A review. *Bacteria* 3(2), 59-75.
- Houmairi H., Oubayoucef A., Idrissi I., & Krimi F. B. (2018).** Haute prévalence de *Fusarium* spp. associés aux grains de céréales dans la région centrale du Maroc: risques pathogénique et toxigène. *Revue Marocaine des Sciences Agronomiques et Vétérinaires* 6(3), 355-361.
- Imran Z. K. (2011).** Isolation and identification species of *Ulocladium preuss* from different regions in Iraq. *Basrah Journal of Agricultural Sciences* 24(2), 27-46.
- Khan N., Bano A., Ali S. & Babar M. A. (2020).** Crosstalk amongst phytohormones from planta and PGPR under biotic and abiotic stresses. *Plant Growth Regulation* 90, 189-203.
- Mardanov A. M., Hadiyeva G. F., Lutfullin M. T., Khilyas I. V. E., Minnullina L. F., Gilyazeva A. G. & Sharipova M. R. (2016).** *Bacillus subtilis* strains with antifungal activity against the phytopathogenic fungi. *Agricultural sciences* 8(1), 1-20.
- Marpaung A. E. & Susilowati D. N. (2021).** Isolation and identification of phosphate solubilising bacteria from potato rhizosphere on andisol. In IOP Conference Series: *Earth and Environmental Science* 810(1), 012041.
- Masciarelli O., Lianes A. & Luna V. (2014).** A new PGPR co-inoculated with *Bradyrhizobium japonicum* enhances soybean nodulation. *Microbiological research*, 169(7-8) 609-615.
- Matny O. (2015).** *Fusarium* Head Blight and Crown Rot on wheat and barley: losses and health risks. *Advances in Plants & Agriculture Research* 2, 2-7.
- Meddas S.A., Oulebsir- Mohandkasi H., Hadjouti R., Reghmit N., Houas Y., Amirat D., Naitbonda L. & Doumandji-Mitche B. (2020).** Caractérisation des *Bacillus* spp. isolées du sol d'Olivier et étude de leurs potentialités de biocontrôle contre la mouche de l'Olive *Dacus oleae* (GMEL) au Nord de l'Algérie. *Revue Agrobiologia* 10(1), 1872-1882.
- Milet A. & Kacem Chaouche N. (2017).** Isolement de microorganismes à partir du sol des régions arides et sélection d'isolats à effet antagoniste sur l'agent de l'Alternariose. Thèse de doctorat, Université Frères Mentouri-Constantine 1.
- Miljaković D., Marinković J., & Balešević-Tubić S. (2020).** The significance of *Bacillus* spp. in disease suppression and growth promotion of field and vegetable crops. *Microorganisms* 8(7), 1037.
- Mohammadi A. & Bahramikia S. (2019).** Molecular identification and genetic variation of *Alternaria* species isolated from tomatoes using ITS1 sequencing and inter simple sequence repeat methods. *Current Medical Mycology* 5(2), 1.
- Mougou I. & Boughalleb-M'hamdi N. (2018).** Biocontrol of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* affecting citrus orchards in Tunisia by using indigenous *Bacillus* spp. and garlic extract. *Egyptian Journal of Biological Pest Control* 28(1), 60.

- Msarah M. J., Ibrahim I., Hamid A. A. & Aqma W. S. (2020).** Optimisation and production of alpha amylase from thermophilic *Bacillus* spp. and its application in food waste biodegradation. *Heliyon* 6(6), e04183.
- Murugan L., Krishnan N., Venkataravanappa V., Saha S., Mishra A. K., Sharma B. K. & Rai A. B. (2020).** Molecular characterization and race identification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* infecting tomato in India, *3 Biotech* 10, 1-12.
- Nabti E., 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 northwestern Algeria. *European Journal of Soil Biology* 61, 20-26.
- Nacef H. S., Ferdjoui S., Chaibi S., & Ramla K. (2022).** Activité antimicrobienne des champignons endophytes et de l'huile essentielle de la plante médicinale *Lavandula officinalis*: Étude comparative. *Agrobiologia* 12(2), 3192-3203
- Odoh C. K. (2017).** Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): a bioprotectant bioinoculant for sustainable agrobiology. *A review. International Journal of Advanced Research in Biological Sciences* 4(5), 123-142.
- O'Donnell K., Ward T. J., Robert V. A., Crous P. W., Geiser D. M., & Kang S. (2015).** DNA sequence-based identification of *Fusarium*: current status and future directions. *Phytoparasitica* 43, 583-595.
- Overy D. P., Rämä T., Oosterhuis R., Walker A. K. & Pang K. L. (2019).** The neglected marine fungi, *sensu stricto*, and their isolation for natural products' discovery. *Marine Drugs* 17(1), 42.
- Patriarca A., & Pinto V. F. (2018).** *Alternaria*. *Food Science*, 1-8.
- Prastiyanto, M. E., Kartika, A. I., Sri, D., & Radja, O. K. (2022).** Bioprospecting of bacterial symbionts of sponge *Spongia officinalis* from *Savu Sea*, Indonesia for antibacterial potential against multidrug-resistant bacteria. *Bacterial symbionts of sponge Spongia officinalis from Savu* 23(2), 1118-1124.
- Punja Z. K., Rodriguez G., Tirajoh A. & Formby S. (2016).** Role of fruit surface mycoflora, wounding and storage conditions on post-harvest disease development on greenhouse tomatoes. *Canadian journal of plant pathology* 38(4), 448-459.
- Rabbee M. F., Ali M. S., Choi J., Hwang B. S., Jeong S. C. & Baek K. H. (2019).** *Bacillus velezensis*: a valuable member of bioactive molecules within plant microbiomes. *Molecules* 24(6), 1046.
- Rai A., Bensidhoum L., Tabli N., Bouaoud Y., Naili F., Cristina 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), 2395-6011.
- Reetha S., Selvakumar G., Bhuvanewari G., Thamizhiniyan P. & Ravimycin T. (2014).** Screening of cellulase and pectinase by using *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis*. *International Letters of Natural Sciences*, 8(2).
- Sadrati N., Zerroug A., Demirel R., Bakli S., & Harzallah D. (2020).** Antimicrobial activity of secondary metabolites produced by *Aspergillus neobridgeri* isolated from *Pistacia lentiscus* against multi-drug resistant bacteria. *Bangladesh Journal of Pharmacology* 15(3), 82-95.
- Sajad A. M. & Abid H. Q. (2017).** Fungi associated with the spoilage of post-harvest tomato fruits and their frequency of occurrences in different markets of jabalpur, Madhya-Pradesh, India. *International Journal of Current Research and Review* 9(5), 12.

- Savary S., Willocquet L., Pethybridge S. J., Esker P., McRoberts N., & Nelson A. (2019). The global burden of pathogens and pests on major food crops. *Nature ecology & evolution* 3(3), 430-439.
- Shah A., Nazari M., Antar M., Msimbira L. A., Naamala J., Lyu D., Rabileh M., Zajonc J. & Smith D. L. (2021). PGPR in agriculture: A sustainable approach to increasing climate change resilience. *Frontiers in Sustainable Food Systems* 5, 667546.
- Shanthi A. T. & Vittal R. R. (2013). Biocontrol potentials of plant growth promoting rhizobacteria against *Fusarium* wilt disease of cucurbit. *International Journal of Phytopathology* 2(3), 155-161.
- Singh B. P., Rateb M. E., Rodriguez-Couto S. & Polizeli Mdltdm L. W. (2019). Editorial: microbial secondary metabolites: recent developments and technological challenges. *Front Microbiol* 10, 914.
- Sinha D., Mukherjee S. & Mahapatra D. (2021). The eighth chapter: Multifaceted potential of plant growth promoting Rhizobacteria (PGPR): An overview. *Handbook of Research on Microbial Remediation and Microbial Biotechnology for Sustainable Soil*, 205-268.
- Smail L., Berdja S., Boualem S., Neggazi S., Boumaza S., Kacimi G., Boudarène L. & Bouguerra S. A. (2017). Effet thérapeutique de l'extrait aqueux de *Globularia alypum* suite à une insulinoxicité induite in vitro sur les cardiomyocytes de *Rattus norvegicus*. [Therapeutic effect of aqueous extract of *Globularia alypum* following in vitro insulin induced toxicity on *Rattus norvegicus* cardiomyocytes]. *Nutrition & Santé* 6(1), 27-35.
- Tabli N., Rai A., Bensidhoum L., Palmieri G., Gogliettino M., Cocca E., Consiglio C., Cillo F., Bubici G. & Nabti E. (2018). Plant growth promoting and inducible antifungal activities of irrigation well water-bacteria. *Biological control* 117, 78-86.
- Tia E. V., Adima A. A. & Menut C. (2023). Étude des caractéristiques physicochimiques et de l'activité antifongique des huiles essentielles d'*Erigeron floribundus* (Kunth.) Sch. Bip. *Phytothérapie* 21(2-3), 87-93.
- Tiendrebeogo A., Bonzi S., Dabiré G. T., Son D., Sanou A., Kambire H. S., Somda I. & Legrève A. (2023). Identification de mycètes cultivables associés aux maladies de la tomate au Burkina Faso. *BASE. Biotechnol. Agron. Soc. Environ* 27(4), 255-269.
- Tiendrebeogo A., Ouedraogo I., Bonzi S. & Kassankogno A. I. (2017). Etude de l'activité antifongique d'extraits de *Cymbopogon citratus* (DC.) Stap, *Eclipta alba* L., *Lippia multiflora* M. et *Agave sisalana* P. *International Journal of Biological and Chemical Sciences* 11(3), 1202-1211.
- Van Gansberghe P., Declerck S., & Calonne M. (2021). Effets de *Rhizophagus irregularis* et de *Bacillus velezensis*, seuls ou combinés, sur le développement du blé infecté ou non par *Zymoseptoria tritici* en conditions semi-hydroponiques. Mémoire de maîtrise, Université Catholique de Louvain.
- Wise K., Woloshuk C., & Freije A. (2015). *Fusarium* Head Blight (Head Scab). *Diseases of Wheat. C. Woloshuk. West Lafayette, Indiana, Purdue Extension*.
- You W., Ge C., Jiang Z., Chen M., Li W. & Shao Y. (2021). Screening of a broad-spectrum antagonist-*Bacillus siamensis*, and its possible mechanisms to control postharvest disease in tropical fruits. *Biological Control* 157, 104584.
- Zerroug A., Sadrati N., Demirel R., Bakli S., & Harzallah D. (2018). Antibacterial activity of endophytic fungus, *Penicillium griseofulvum* MPR1 isolated from medicinal plant, *Mentha pulegium* L. *African Journal of Microbiology Research* 12(48), 1056-1066.

Zothanpuia Passari A. K., Leo V. V., Chandra P., Kumar B., Nayak C., Hashem A., Abd-Allah E. F., Alqarawi A.A. & Singh B. P. (2018). Bioprospection of actinobacteria derived from freshwater sediments for their potential to produce antimicrobial compounds. *Microbial cell factories* 17, 1-14.

Annexes

Annexe 1

Matériel végétale

Globularia alypum

Globularia alypum, une plante sauvage de la famille des *Globulariceae*, est un arbuste vivace largement répandu dans toute la région méditerranéenne. Dans la pharmacopée traditionnelle algérienne, elle est connue sous le nom local (Tassalgha), elle est utilisée depuis longtemps comme remède végétal. Ses feuilles sont particulièrement prisées pour leurs propriétés hypoglycémiantes et leur utilisation dans le traitement des affections cardiovasculaires et rénales (Smail et al., 2017).

Annexe 2

Composition des milieux de culture

✓ Milieu PDA (Potato Dextrose d'Agar)

-200g de pomme de terre découpés

-mis en ébullition dans un récipient contenant 500ml d'eau distillée pendant 20min

-20g de glucose

-17g d'agar agar

-complété à 1000ml par l'eau distillée

✓ Milieu de Fermentation

- 8g BN

- 12,4g Tryptone

- 1,5g K₂HPO₄ .3H₂O

- 0,04g MNSO₄.H₂O

- 1,67g FeSO₄.7H₂O

- 1,22g MgCl₂ .6H₂O

- 1000ml Eau distillée

pH 7,1

✓ Eau physiologique

- 9g NaCl

- 1000ml d'eau distillée

Milieux pour teste enzymatiques

✓ La gélose de Gause

- 1g KNO₃

- 0,5g K₂HPO₄

- 0,5g MgSO₄

- 0,5g NaCl
- 0,01g FeSO₄
- 20g Amidon
- 30g Agar
- 1000ml Eau distillée

✓ **La gélose à la cellulose (CMC)**

- 0,5g cellulose
- 0,1g NaNO₃
- 0,1g K₂HPO₄
- 0,05g MgSO₄
- 0,05g Extrait de levure
- 15g Agar
- 1000ml Eau distillée

✓ **La gélose au lait écrémé**

- 10g Peptone
- 05g NaCl
- 03g Extrait de levure
- 20g Agar
- 50ml Lait écrémé
- 1000ml Eau distillée

Colorants

❖ **La solution de lugol**

- 2g iodure de potassium
- 1g Iode métalloïde 12
- 100ml Eau distillée

تهدف هذه الدراسة إلى تحليل عينات التربة الجذرية لنبات *Globularia alypum* في الجزائر لتقييم التأثير المضاد لبكتيريا *Bacillus* sp. ضد مختلف الفطريات الممرضة للنبات والبكتيريا الممرضة للإنسان. بعد تحديد الخصائص بالعين المجردة وتحت المجهر، تم تحديد الفطريات المعزولة على أنها *Alternaria alternata* و *Fusarium oxysporum* و *Ulocladium botrytis*. بعد ذلك، تم اختبار 48 عزلة من *Bacillus* على قدرتها المضادة. أظهرت العزلة B15 نشاطاً مضاداً للفطريات بشكل كبير ضد الفطريات الثلاثة، مع نسب تثبيط بلغت 65.51% و 49.43% و 50.71% على التوالي. أظهرت العزلات B1 و B47 و B18 نشاطاً مضاداً للبكتيريا بشكل ملحوظ ضد *Staphylococcus aureus*. عزلات كانت نشطة ضد *Ulocladium botrytis* و *Alternaria alternata*، بينما كانت ثلاث عزلات أخرى نشطة فقط ضد *Alternaria alternata* أظهرت العزلات B15 و B48 قدرة تثبيط أفضل ضد *Ulocladium botrytis* و *Alternaria alternata*، مع مناطق تثبيط بلغت 34 ± 0.5 و 22.25 ± 2.25 ميليمتر و 2.25 ± 2.25 ميليمتر على التوالي. في المقابل، لم يتم ملاحظة أي نشاط ضد *Fusarium oxysporum*. كشفت التقييمات الإنزيمية عن تباين في مؤشرات الإنزيمات، باستثناء العزلة B33، التي لم تظهر أي نشاط لتحليل السليولوز أو البروتين. كانت أفضل العزلات المنتجة للإنزيمات البروتينية هي العزلات B15 و B23، مع مؤشرات إنزيمية بلغت 2.9 و 2.06 على التوالي. بالنسبة للنشاط السليولوزي، تم الحصول على أفضل المؤشرات من العزلات B18 و B12 و B48، بقيم بلغت 6.67 و 5.83 و 5.25 على التوالي. بالإضافة إلى ذلك، لم تكن أي عزلة قادرة على إنتاج الأميلاز. في الختام، أثبتت سلالات *Bacillus* فعاليتها في المختبر من خلال اختبارات التضاد وقدرتها على إنتاج الإنزيمات المحللة. وهذا يجعلها مصدراً واعداً في المجال الزراعي، مما يوفر حلاً محتملاً للمشاكل التي تسببها الفطريات الممرضة للنباتات.

كلمات مفتاحية: *Globularia alypum*، *Bacillus* sp.، فطريات مرضية نباتية، منافس، PGPR، إنزيمات محللة.

Résumé

Cette étude a pour objectif d'analyser des échantillons de sol rhizosphérique de *Globularia alypum* en Algérie afin d'évaluer l'effet antagoniste de *Bacillus* sp. contre divers champignons phytopathogènes et bactéries pathogènes pour l'homme. Après l'identification macro et micro-morphologiques, les champignons isolés ont été identifiés comme étant *Alternaria alternata*, *Fusarium oxysporum* et *Ulocladium botrytis*. Les 48 isolats de *Bacillus* obtenus ont ensuite été testés pour leur pouvoir antagoniste. L'isolat B15 a montré une activité antifongique significative contre les trois champignons, avec des pourcentages d'inhibition respectifs de 65,51 %, 49,43 % et 50,71 %. Les isolats B1, B47 et B18 ont montré une activité antibactérienne notable contre *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus* et *Escherichia coli*, avec des zones d'inhibition atteignant jusqu'à 44,5 mm. Les résultats de l'activité antimicrobienne des filtrats, évalués par la méthode des puits, ont révélé que trois isolats étaient actifs contre *Alternaria alternata* et *Ulocladium botrytis*, tandis que trois autres isolats étaient actifs uniquement contre *Alternaria alternata*. Les isolats B15 et B48 ont montré une capacité d'inhibition meilleure contre *Alternaria alternata* et *Ulocladium botrytis*, avec des zones d'inhibition mesurant respectivement $34 \pm 0,5$ mm et $22,25 \pm 2,25$ mm. En revanche, aucune activité n'a été observée contre *Fusarium oxysporum*. L'évaluation enzymatique a révélé une variabilité des indices enzymatiques, à l'exception de l'isolat B33, qui n'a montré aucune activité cellulolytique ni protéolytique. Les meilleurs producteurs d'enzymes protéolytiques étaient les isolats B23 et B15, avec des indices enzymatiques de 2,9 et 2,06 respectivement. Pour l'activité cellulolytique, les meilleurs indices ont été obtenus par les isolats B18, B12 et B48, avec des valeurs de 6,67, 5,83 et 5,25 respectivement. De plus, aucun isolat n'a été capable de produire de l'amylase. En conclusion, les isolats de *Bacillus* ont montré leur efficacité in vitro à travers des tests d'antagonisme et leur capacité à produire des enzymes hydrolytiques. Cela en fait une source prometteuse pour le domaine agricole, offrant des solutions potentielles aux problèmes posés par les phytopathogènes.

Mots-clés : *Bacillus* sp., *Globularia alypum*, Champignons phytopathogènes, Antagoniste, PGPR, Enzymes hydrolytiques.

Abstract

This study aims to analyze rhizospheric soil samples of *Globularia alypum* in Algeria to evaluate the antagonistic effect of *Bacillus* sp. against various phytopathogenic fungi and human pathogenic bacteria. After macro and micro-morphological identification, the isolated fungi were identified as *Alternaria alternata*, *Fusarium oxysporum*, and *Ulocladium botrytis*. The 48 *Bacillus* isolates obtained were then tested for their antagonistic potential. Isolate B15 showed significant antifungal activity against the three fungi, with inhibition percentages of 65.51%, 49.43%, and 50.71%, respectively. Isolates B1, B47, and B18 demonstrated notable antibacterial activity against *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, and *Escherichia coli*, with inhibition zones reaching up to 44.5 mm. The results of the antimicrobial activity of the filtrates, evaluated by the well diffusion method, revealed that three isolates were active against *Alternaria alternata* and *Ulocladium botrytis*, while three other isolates were active only against *Alternaria alternata*. Isolates B15 and B48 showed better inhibition capacity against *Alternaria alternata* and *Ulocladium botrytis*, with inhibition zones measuring 34 ± 0.5 mm and 22.25 ± 2.25 mm, respectively. In contrast, no activity was observed against *Fusarium oxysporum*. The enzymatic evaluation revealed variability in enzymatic indices, except for isolate B33, which showed no cellulolytic or proteolytic activity. The best producers of proteolytic enzyme were isolates B23 and B15, with enzymatic indices of 2.9 and 2.06, respectively. For cellulolytic activity, the best indices were obtained by isolates B18, B12, and B48, with values of 6.67, 5.83, and 5.25, respectively. Additionally, no isolate was able to produce the amylase. In conclusion, the *Bacillus* isolates were demonstrated their efficacy in vitro through antagonism tests and their ability to produce hydrolytic enzymes. This makes them a promising source for the agricultural field, offering potential solutions to the problems posed by phytopathogens.

Keywords: *Bacillus* sp., *Globularia alypum*, Phytopathogenic fungi, Antagonist, PGPR, Hydrolytic enzymes.