**5- Discussion**

L’expansion rapide de la population mondiale que la terre a connue pendant le XXe siècle a conduit à l’apparition de la révolution agricole qui a fait appel à l’utilisation intensive des organismes génétiquement modifiés (OGM), des engrais et des pesticides chimiques (Cartillier, 1977). Ceci a provoqué beaucoup de nuisances et d’effets négatifs, sur l’environnement et par conséquent sur la santé de l’homme. (Bruinsma, 2009 ; Tilman *et al.,* 2002).

L’agriculture biologique a été adoptée comme solution alternative à l’agriculture intensive, dans le but de diminuer les risques liés à l’usage des pesticides. Il s’agit d’une politique agraire qui exclut l’utilisation des produits phytosanitaire chimiques et utilise des traitements naturels dits « Biopesticides » (COLEACP, 2011). Le genre *Bacillus* appartient au groupe de rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes  (PGPRs : plant growth promoting rhizobacteria), largement utilisées en agriculture comme agents naturels de biocontrôle (McSpadden- Gardener, 2004).

La caractérisation des bactéries du genre *Bacillus*, pour leur capacités de promotion et de protection des plantes, *in vitro* et *in situ,* a été réalisée sur des souches isolées de la rhizososphère de diverses cultures agricoles (Beneduzi *et al.,* 2008; Pamela *et al.,* 2010 ; Aris *et al.,* 2011). En revanche, les souches de *Bacillus* étudiées dans le présent travail, sont isolées des environnements divers de l’Est d’Algérie, à savoir : l’eau du lac salé d’Ain M’lila et la rhizosphere d’une plante située à sa proximité ; l’eau de la source thermale d’Oued El Athmanya et le sol situé à sa proximité et la rhizosphère de la plante médicinale *Calendula officinalis,* cultivée en serre dans la région de Setif. Les sites d’échantillonnage sont choisis par rapport à leur importance. En effet, les milieux particuliers explorés dans cette étude constituent une source écologique importante d’isolement des microorganismes résistants, ayant des caractéristiques phénotypiques et génotypiques particulières comme il a été préconisé par De Carvalho et Pedro, (2010);Dib *et al.,* (2009) qu’ont exploré des milieux similaires. Par ailleurs, la plante *C. officinalis* est une herbe médicinale importante, menacée par des pertes significatives causées par diverses moisissures phytopathogènes (Muley *et al.,* 2009 ; Pieta,1991).

Il est intéressant de noter que, l’ensemble des échantillons du lac salé et de la source thermale, prélevés dans ce travail, appartiennent à des écosystèmes extrêmes. En effet, L’interprétation des valeurs de la conductivité électrique (CE), a permis de montrer que l’eau du lac salé possède 17.970 mS/ cm, le sol environnant du lac salé englobe 8. 93 mS/ cm et le sol environnant de la source thermale renferme 9.60 mS/ cm, ce qui prouve qu’ils sont extrêmement salés, selon la classification de Richard. (1969). Par ailleurs, la température de l’eau de la source thermale d’Oued El Alathmanya est très élevée, atteignant ainsi 80°C (Leghlimi, 2013). En complément, les échantillons du sol prélevés de ces milieux extrême contiennent un taux négligeable de matières organique en comparaison avec le sol prélevé de la rhizosphere de la plante *C. officinalis*.

Le genre *Bacillus* représente un large nombre de microorganismes communément isolés du sol et du sol rhizosphériques (Liu *et al.,* 2010 ; McSpadden- Gardener, 2004 ). En effet, l’exploration des échantillons, récoltés dans le présent travail, a abouti à l’isolement de 39 isolats de *Bacillus* repartis sur les différents sites investis. Neuf souches sont isolées du site d’Ain M’lila, quatre du site d’Oued El Athmanya et vingt six de la rhizosphère de *C. officinalis.* La présence des bactéries formatrices d’endospores (endospores forming bacteria) dont le genre *Bacillus* fait partie, dans les lacs salés, les sources thermales et la rhizosphère de certaines plantes médicinales, a été précédemment citée par quelques auteurs. Ainsi, Ebrahiminezhad *et al.* (2011) ont isolé à partir du lac salé de Maharloo des souches appartenant à *Bacillus endophyticus*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus pumilus, Bacillus simplex, Bacillus amyloliquefaciens, Bacillus vallismortis, Bacillus aquimaris* et *Paenibacillus sp.* En outre*,* les souches bactériennes, *Anoxybacillus flavithermus*, *Geobacillus stearothermophilus* et *Bacillus licheniformis* ontété isolées à partir de la source thermaleSavusade Fiji (Vinay, 2008). Enfin, Köberl *et al.* (2012) ont révélé la présence des souches de *Bacillus sp.* et *Paenibacillus sp.* dans la rhizosphere d’un ensemble de plantes médicinales, incluant *Matricaria chamomilla*, *Calendula officinalis* et *Solanum distichum.*

Le test d’antagonisme effectué dans le présent travail, sur PDA, a permis de sélectionner onze isolats développant une activité antifongique vis-à-vis de certaines moisissures phytopathogènes en l’occurrence : *Alternaria alternata, Aspergillus niger, Botrytis cinerea, Cladosporium cucumerinium, Fusarium oxysporium* et *Fusarium sp.* Plusieurs études ont décrit les effets antifongiques, *in vitro,* des souches de *Bacillus sp.* vis à vis d’une panoplie de moisissures phytopathogènes (Schippers *et al.,* 1992,Jongsik et Kyung, 2000 ; Gong *et al.,* 2006 ; Ongena *et al.*,2007).

Le calcul de taux d’inhibition de la croissance fongique par les isolats sélectionnés réalisé à titre d’exemple, sur *F. oxysporium* et *B. cinerea,* a permis de constater que sa valeur varie entre 39%et 84% suivant l’isolat. Sur la même idée Toure *et al.* (2004) ont trouvé que le taux d’inhibition de la croissance de *F. oxysporium* et *B. cinerea* par la souche *B. amyloliquefaciens* (GA1)était 58% et 70%, respectivement, et ceci révèle **l’importance de certaines des souches sélectionnées dans ce travail.**

Les tests d’identification préliminaires, morphologique et physiologique des isolats sélectionnés, ont confirmé que tous les isolats appartiennent au genre *Bacillus*. Néanmoins, l’identification moléculaire des isolats par l’analyse d’*ADN 16S* a montré qu’un des isolats n’appartient pas au genre *Bacillus* comme préconisé mais, il représente *Paenibacillus polymyxa.* Les autres isolats représentant le genre *Bacillus* appartiennent en réalité au groupe *Bacillus subtilis* qui englobe plusieurs espèces. En complément, l’analyse des séquences de *gyrase A* distingue ces espèces les unes des autres. De ce fait, les bacilles isolés d’Ain M’lila sont identifiés comme étant *B. amyloliquefaciens*, ceux isolés d’Oued El Athmanya appartiennent aux espèces, *B. amyloliquefaciens*, *B. atrophaeus* et *B. mojavensis.* Enfin, les bactéries isolées de la rhizosphère de *C. officinalis*, sont des *B. velezensis*, *B. amyloliquefaciens* et *B. subtilis subsp. spizezenii*, en outre de l’espèce précédemment citée.

Sous des conditions de limitation de nutriments, le groupe “*Bacillus subtilis*” entame un processus de différentiation qui convertit la forme végétative des cellules en spores. Cette forme résiste aux différents types de stress physicochimique, ce qui facilite leur production et leur formulation industrielle en un produit stable (Errington, 2003). Le genre *Bacillus* etles membres dugroupe *B. subtilis* en particulier, constituent de bons candidats pour diverses applications biotechnologiques, pharmaceutiques, agricoles et agroalimentaires (Senesi *et al.,* 2004). Dans cette étude, la production des spores de souches de *Bacillus* en fiole dans des conditions non optimalisées de sporulation, ont permis de constater que les taux de sporulation varient entre 2.2x109 et 2.7x109 spores/ ml. Dans des conditions optimales de production de spores*,* en fiole, Bing-Lan et Yew-Min. (1998), ont enregistré un taux de sporulation atteignant 8.35 x108 spores /ml chez *B. thuringiensis* (YMB 96-1988). Par ailleurs, et dans un autre travail *B. subtilis* (WHK-Z12) produit en fin de culture 1,52x 1010 spores/ml (Chen *et al.,* 2010).

Le phénomène d’antibiose a été observé *in vitro,* chez toutes les souches de *Bacillus* sélectionnées dans ce travail. Siddiqui. (2005) ont lié ce phénomène à plusieurs mécanismes, en l’occurrence, la sécrétion des enzymes dégradant la paroi des cellules microbiennes (cell-wall degrading enzymes) et des substances antimicrobiennes; la compétition pour les nutriments et la combinaison de tous ces mécanismes.

Dans le présent travail, seules les souches de *B. amyloliquefaciens* étudiées sont capables de produire de la protéase. Cependant, l’activité cellulasique est observée chez toutes les espèces de *Bacillus* étudiées exceptant le *B. atrophaeus* qui est le seul à produire de la chitinase. Ces enzymes agissent par le mécanisme de mycoparasitisme, grâce à leur rôle intégral dans l’altération physique directe des parois cellulaires (Praveen Kumar *et al.,* 2012;Cho *et al.,* 2011)*.*

Les trois familles de lipopeptides (LPs), y compris les iturines, les fengycines et les surfactines sont des substances antimicrobiennes connues pour leurs propriétés surfactants et antifongiques (Sandrin *et al.*, 1990; Ongena *et al.*, 2007; Malfanova *et al.*, 2012). Par ailleurs, les LPs incitent les souches de *Bacillus* à coloniser les racines des plantes, à former des biofilms (Bonmatin *et al.,* 2003; Raaijmakers *et al.,* 2006; Leclere *et al.,* 2006) et ils stimulent le système immunitaire des plantes (Induced systemic resistance:ISR), comme démontré par Ongena *et al.* (2007) et Jourdan *et al.* (2009). Dans cette étude, les souches de *B. amyloliquefaciens* isolées d’Ain M’lila et de Oued El Athmanya et la souche *B. velezensis* (26SRTS) isolée de la rhizosphere de *C. officinalis*, produisent les trois familles de lipopeptides, en l’occurrence, iturine A et bacillomycine D C14-C16 (variantes de la famille des iturines); surfactines C12-C16, et fengycines A et/ou B C14-C19 (variantes de la famille des fengycines). En revanche, la production des fengycines est absente dans le cas des souches *B.subtilis subsp. spizezenii* (23SRTS), *B.amyloliquefaciens* (9SRTS) et *B. atrophaeus* (6SEL). Enfin, la production des surfactines a été détectée chez la plupart des souches exceptant le *B. mojavensis* (9SEL) etle *P. polymyxa* (18SRTS) qui ne produit aucune famille des LPs. Dans la littérature fouillée, la production des iturines semble être limitée aux espèces *B. subtilis* (Bonmatin *et al.,* 2003) et *B. amyloliquefaciens* (Koumoutsi *et al.,* 2004), tandis que, les surfactines ont été détectées chez *B. coagulans* (Huszcza et Burczyk, 2006), chez *B. pumilus* et chez *B. licheniformis* (Peypoux *et al.,* 1999). Enfin, la production des fengycines a été identifiée chez *B. cereus* (Tsuge *et al.,* 1999) et *B. thuringiensis* (Kim *et al.,* 2004) en plus de *B. subtilis* (Jacques *et al.,* 1999) et *B. amyloliquefaciens* (Koumoutsi *et al.,* 2004).

Diverse variantes de fengycines sont décrites dans la littérature, en l’occurrence, fengycine A et B (Esumi *et al.,* 2003; Ongena et Jacques, 2008; Stein, 2005; Vater *et al.,* 2002), fengycine C, D et S (Yu Li *et al.*, 2012) et fengycin A2, B2 et C (Pathak *et al.*, 2012). **Il est très intéressant de signaler** **que dans le présent travail, des pics additionnels ont de nouvelles masses proches de celles des MH+ de fengycines conventionnelles sont détectés chez les *B. amyloliquefaciens* (Rh2.A’, ET, Rh2.F et SI), isolés du lac salé et de la source thermale.**

Les analyses de spectrométrie de masse couplée à l’HPLC (LC-MS.MS), avec une méthode de fragmentation, type CID (collision-induced dissociation), appliquées sur l’extrait des fengycines produites par *B. amyloliquefaciens* (ET) ont permis de déceler que **la majorité des homologues de fengycines produits par cette souche sont à chaine d’acide gras insaturé,** **en plus des nouveaux homologues de fengycines A et B, ayant des chaines d’acides gras à 20 et à 18 atomes de carbone, respectivement, chose qui est rare chez les membres du groupe *B. subtilis.* Par ailleurs,deux nouvelles variantes de fengycines (fengycine X et Y) ont été décrites pour la première fois dans ce travail.** Il a été, en effet, abouti que le cycle peptidique de la fengycine X (nouvelle) diffère de celui de la fengycine A (conventionnelle) dans l’acide aminé glutamine (Q) qui a été substitué par l’isoleucine (I) ou leucine (L). Cette mutation doit être la même pour fengycine Y (nouvelle) mais, par rapport à la fengycine B (conventionnelle). **Ces nouvelles substances n’ont pas été comparées, faut d’absence de similaires dans la littérature, ce qui permettra de proposer une élaboration d’un brevet.**

Sur un autre volet, les siderophores sont utilisés comme des molécules clés dans le phénomène de compétition développé par les microorganismes producteurs vis-à-vis de la flore de l’écosystème qu’ils occupent (Beneduzi *et al.,* 2008). Les siderophores sont des molécules à faible poids moléculaires, ayant une forte affinité à l’ion Fe+3. Elles sont secrétées sous des conditions de déficit en fer. Une fois le complexe siderophore- Fe+3 est formé, la membrane externe de la cellule microbienne productrice de siderophores catalyse l’internalisation de ces complexes (Neilands, 1995). Dans ce travail, toutes les souches de *Bacillus* sélectionnées montrent une activité importante de production de sidérophores en développant sur milieu CAS des zones jaune-orange allant de 7 à 10 mm de diamètre alors que le *P. polymyxa* (18SRTS) ne produit aucune trace de sidérophores.

Les PGPRs (pour *Plant Growth Promoting Rhizobacteria*) peuvent promouvoir la croissance des plantes d’une façon directe via la production des phytohormones comme l’indole 3 acide acétique (IAA), les cytokines et les gibbérellines (Bloemberg et Lugtenberg 2001; Bottini *et al.,* 2004). L’IAA a été détectée chez 80% des bactéries isolées de la rhizosphere des plantes. En revanche, peu d’études ont fait le point sur la capacité des bacilles du sol, à produire d’IAA (Vandeputte *et al.,* 2005). Toutes les souches de *Bacillus,* dans le présent travail, produisent de petites quantités d’indole 3 acide acétique (IAA) qui varient entre 6,5 et 14 µg/ml. Par ailleurs, il a été constaté que, le *P. polymyxa* (18SRTS) produit une concentration largement plus importante d’IAA atteignant 53 µg/ml, ce qui procure à ces souches un intérêt grandissant.

Les interactions les plus complexes et les plus importantes entre les plantes et les microorganismes se situent dans les racines des plantes et la partie du sol adjacente, appelée rhizosphère (Hirsch *et al.,* 2003). En outre, le rôle des exsudats racinaires dans les interactions plante-microorganismes a été mis en évidence récemment par plusieurs chercheurs (Somers *et al.,* 2004; Badriet Vivanco, 2009; Cawoy *et al.,* 2011). En effet, il a été démontré que les rhizobactéries s’attirent vers les racines des plantes sous l’effet des exsudats racinaires, via le phénomène de chimiotaxie(Chet et Mitchell, 1976). Cette réponse chimotaxique et la division cellulaire des bactéries dans des exsudats racinaires peut être un fait important, impliqué dans l'établissement de la colonisation des racines, comme décrit par Weller(1988) et De Weert *et al.* (2002). Dans ce travail, les souches *B. amyloliquefaciens* (ET), *B. atrophaeus* (6SEL) et *B. mojavensis* (9SEL) s’avèrent capables de développer un effet antagoniste vis-à-vis d’*Alternaria alternata* sur divers milieux solides, où la seule source de carbone et d’azote était principalement des exsudats racinaires de tomate(*S. lycopersicum* cv. *Tondo rosso*), de courgette (*C. pepo* cv. Xara) et d’haricot (*P. vulgaris* cv. *Borlotto*), obtenus à 25°C. Par ailleurs, les souches *B. amyloliquefaciens* (9SRTS), *B. subtilis* subsp.*spizizenii* (23SRTS) et *B. velezensis* (26SRTS), développent un effet inhibiteur vis-à-vis de *Fusarium oxysporium* et *A. alternata*, sur des exsudats de tomates (*S. lycopersicum* cv. *Tondo rosso*), obtenus à 15°C, 20°C, 28°C et 35°C. Ces résultats montrent l’effet de la nature de la plante hôte et de la température de culture sur l’efficacité des souches de *Bacillus* testées d’un coté et prouve la possibilité que ces souches soient efficaces dans le biocontrol des cultures de tomate, de courgette et d’haricot, dans des conditions de températures diverses, d’un autre coté.

La majorité des biopesticides microbiens utilisés à travers le monde sont d’origine bactérienne (Shoresh *et al.,* 2010) et le *Bacillus* *subtilis* constitue le groupe bactérien le plus étudié dans la recherche scientifique et le plus exploité industriellement, et vendus sur le marché comme agents de biocontrôle. Dans ce travail, la production des *B.amyloliquefaciens* (9SRTS); *B. atrophaeus* (6SEL) et *B. subtilis* subsp. *spizezenii* (23SRT), danslebioréacteur de 500 L (Société Artechno S.A- Belgique), a permis de constater l’importance économique de ces souches. En effet, la concentration de spores produites, en fin de fermentation, varie entre 8 x 109 et 1 x 1010 spores/ml. En plus, la concentration de cellules vivante par gramme de produit lyophilisé est entre 6 x 109 et 1,2 x 1011  cellules/g. Les taux de sporulation obtenus sont plus importants que ceux obtenus dans les études réalisées par Monteiro *et al.* (2005) et Chen *et al.* (2010). Par ailleurs, Korsten et Cook. (1996) ont pu obtenir un produit lyophilisé stable de la souche *Bacillus subtilis* (isolate B246) dont la concentration de cellules vivantes était (1 x 109 cellules/g).

Plusieurs espèces de *Bacillus* sont utilisées pour protéger les terrains agricoles contre les moisissures phytopathogènes. Il s’agit de *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis*, *B. pumilus* et *B. subtilis* (Fravel, 2005). Ces bactéries sont homologuées et commercialisées dans plusieurs pays du monde, comme l’Afrique du Sud, le Chili, les USA, la Thaïlande, le Brésil, le Japon, l’Allemagne et le Canada. Elles sont en fait utilisées comme agents de biocontrôle de plusieurs cultures agricoles, en champs, en serre et en post récolte. Parmi les cultures traitées, on note 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 (Cawoy, 2012; Perez-Garcıa *et al.,* 2011). Dans le présent travail, *B. amyloliquefaciens* (9SRTS), *B. atrophaeus* (6SEL) et *B. subtilis* subsp. *spizezenii* (23SRTS), en plus de la souche de référence *B. amyloliquefaciens* (S499) sont testées *in situ* sur deux variétés de pois chiches (*CV. Flipe 1390* et *Mega grain tradind CO. (P): Kabuli*).Ce légume sec a été choisi car sa production en Algérie connait un manque accru. En effet, l’Algérie recourt au marché extérieur pour combler le déficit en matière de besoins en consommation, avec l’importation de plus de 150 000 tonnes par an, soit 200 millions de dollars, déboursés à cet effet **(Bahri, 2011).**

Les souches bactériennes testées, ici, ont une influence positive sur la promotion et la protection des plantes de pois chiche, dans des conditions de pots et en plein champs. En effet, la souche *B. amyloliquefaciens* (9SRTS) appliquée dans le lot ST-GNT (sol traité-graines non traitées) assure un meilleur effet sur l’augmentation la taille des plantes et la diminution de la gravité de la maladie causée par *Sclerotonia sclerotium,* dans le cas de la variété *CV. Flipe 1390.*Ces paramètres versus le témoin, estimés après un moi de semis, étaient (13 cm vs 10 cm) et (9% vs 63%). Par ailleurs, la souche (9SRTS) diminue significativement la gravité de la maladie de la variété : *Mega grain tradind CO. (P) : Kabuli* (41% vs. 74% : témoin), et augmente le poids des racines (0,31g vs 0,06g). Ces résultats corroborent ceux trouvés par Karimi *et al.* (2012), où plusieurs souches *de B. subtilis* (B1, B6, B28, B40, B99 et B108), avait un effet positif sur la taille des plantes de pois chiche, le poids des racines et leur protection contre *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceri,* estimé après un mois de semiset l’isolat B28 présentait lesmeilleurs effets*.* Par ailleurs, l’inoculation du sol infecté avec du *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceri,* avec cet isolat, avait un effet supérieur, par rapport au lot de graines traitées et semis dans le même type de sol. En effet, le pourcentage de réduction de la maladie était 44% et 39%, respectivement dans ces deux lots (Karimi *et al.*, 2012). En revanche, Moradi *et al.* (2012) ont montré l’absence de différence significative entre l’effet d’inoculation du sol et celui du traitement des graines sur le développement des plantes de pois chiche (variété Pirooz et variété Hashem).

L’inoculation du champ expérimental de ChaabErrsas (Université Metouri 1-Algérie), avec les souches *B.amyloliquefaciens* (9SRTS), *B*. *subtilis* subsp. *spizezenii* (23SRTS), *B. atrophaeus* (6SEL) et la souche type *B. amyloliquefaciens* (S499), a des effets positifs sur le taux de germination des graines de pois chiche (variété *Mega grain tradind CO. (P): Kabuli*), la taille des plantes et le rendement de la récolte. Le meilleur isolat est le *B. amyloliquefaciens* (9SRTS), qui assure un taux de germination des graines important (63% vs 41% pour le lot témoin). En plus la taille des plantes est significativement (p<0,05) élevée, atteignant 23cm et 35cm, après 4 et 6 semaines de semis. Par opposition, dans le lot témoin, la taille des plantes est à 18 cm et 32 cm. Les différents traitements effectués n’ont pas d’effets significatifs (P>0,05) sur le nombre de fruits par plantes ni sur le poids sec des racines et des graines récoltées. En revanche, comme ces traitements influence significativement le taux de germination, le poids total du pois chiche récolté dans le lot traité avec la souche (9SRTS) est plus élevé par rapport au témoin (153 g vs 114 g). Ces données estimées par hectare, se retrouve à (7,65 qt vs 5,7qt), la souche (9SRTS) a permis donc une augmentation du rendement de 2qt/hectare. Des résultats approximatifs ont été trouvés par Abdel-Monaim. (2011) qui a mis en évidence que le traitement des graines de pois chiche (variété : *cv. ‘Giza 3’*) avec le *B. megaterium* a permis la diminution de la gravité de la fonte des semis et l’augmentation du rendement de la production. Cet auteurs a trouvé que le semis dans le mois de Novembre a donné les meilleurs effets, à savoir : (9% vs. 16%) pour le pourcentage de fonte de semis et (664 vs. 525 kg/champs) pour le rendement de la production.