

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 الأخوة منتوري قسنطينة 1

Constantine 1 Frères Mentouri University

Université Frères Mentouri Constantine 1

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Biologie appliquée

Thèse de

Doctorat de troisième cycle

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Biotechnologie Microbienne et Bioprocédés

N° d'ordre : 48/D3C/2024

N° de série : 02/Bio AP/2024

Intitulée :

**Valorisation de la biomasse ligno-cellulosique pour la
recherche et la production de micro-organismes
développant des potentialités de bio-contrôle et étude de
leur application dans l'agriculture.**

Présentée par : **MANSOUR Mehdi**

le : **09/07/2024**

Devant le jury:

Président : KACEM CHAOUCHE Noredidine Prof. Univ. Constantine 1

Directrice de thèse: KARA ALI Mounira Prof. Univ. de Boumerdes

Examineur : DEHIMAT Laid Prof. Univ. Constantine 1

Examineur : BOUDJEMA Khaled Prof. Univ. de Boumerdes

Examinatrice : BENSERRADJ Ouafa MCA Univ. Constantine 1

Examineur : BERKANI Mohammed MCA ENSB Constantine

Année universitaire 2023/2024

Dédicaces.

*Je dédie ce travail à mes parents, à mon frère et son épouse, à
Maroua pour leur soutien indéniable.*

À tous ce qui m'aiment.

Mehdi

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier Madame KARA ALI Mounira Professeur à l'Université M'hamed Bougara, Boumerdès, pour m'avoir fait l'honneur de diriger cette thèse de Doctorat de 3ème cycle. Je la remercie pour ses précieux conseils scientifiques, ses remarques avisées et de m'avoir souvent incité à approfondir mes réflexions méthodologiques. Elle a été rigoureuse et attentive et elle m'a fait bénéficier de ses connaissances. Pour tout cela, je lui suis sincèrement reconnaissant.

Mes sincères remerciements vont à Monsieur KACEM CHAUCHE Noredine Professeur à l'Université Frères Mentouri Constantine 1, et Directeur du Laboratoire de Mycologie, de Biotechnologie et de l'Activité Microbienne (LaMyBAM) qui m'a accueilli au sein de son laboratoire et d'avoir mis à ma disposition tout le matériel nécessaire à la réalisation de ce travail. Je le remercie également d'avoir bien voulu présider ce jury.

Je tiens à remercier Monsieur DEHIMAT Laid, Professeur à l'Université Frères Mentouri Constantine 1 et Doyen de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, d'avoir accepté d'examiner et de juger ce travail.

Tous mes remerciements vont à Monsieur BOUDJEMA Khaled, Professeur à l'Université M'hamed Bougara Boumerdès d'avoir bien voulu accepter d'évaluer ce travail.

Je remercie Madame BENSERADJ Ouafa, Maître de conférences à l'Université Frères Mentouri Constantine 1, de me faire l'honneur de juger cette thèse de Doctorat.

Mes remerciements s'adressent également à Monsieur BERKANI Mohammed, Maître de conférences à l'Ecole Nationale de Biotechnologie d'avoir contribué à la réalisation de ce travail et d'avoir eu la gentillesse de juger cette thèse.

Mes sincères remerciements vont également à Madame FLAHAUT Sigrid, Professeur à l'Université Libre de Bruxelles, de m'avoir accueilli au sein du Laboratoire de Microbiologie Appliquée, Bruxelles (Belgique) afin de finaliser mon travail.

Merci à Monsieur CORNU Bertrand Premier gradué technique à l'institut de recherche LABIRIS, Bruxelles, pour son aide et sa disponibilité.

Mes sincères remerciements vont aussi à Mademoiselle BRAMKI Amina pour son aide.

Je tiens à remercier chaleureusement les ingénieurs des laboratoires de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, en particulier Mesdames FERGANI Mounia, ZEROUGUI Leila et BOUZIDI Nedjat pour leur patience et leur disponibilité.

Merci à mon collègue et ami MAHROUK Abdelkader pour son aide.

Un grand merci à toute l'équipe du Laboratoire de Mycologie, de Biotechnologie et de l'Activité Microbienne (LaMYBAM) pour tous les conseils et remarques qui m'ont grandement aidé pour l'élaboration de cette thèse.

Je tiens à remercier l'ensemble des personnes qui ont contribué de près ou de loin à ma formation.

LISTE DES FIGURES

Figure 1	Structure de la cellulose.	4
Figure 2	Structure de l'hémicellulose.	5
Figure 3	Structure de la lignine.	6
Figure 4	Plant de tomate à croissance déterminée.	13
Figure 5	Plant de tomate à croissance indéterminée.	14
Figure 6	Structure de la surfactine.	34
Figure 7	Structure générale des fengycine.	35
Figure 8	Structure de l'iturine.	36
Figure 9	Echantillonnage : A , Sol et bois de l'arbre de pin ; B , Coques de noix et d'amandes.	41
Figure 10	Dégradation de la matière ligno-cellulosique par l'isolat bactérien (M4): A , cellulase ; C , hémicellulase ; E , laccase ; B , D et F , témoins.	65
Figure 11	Dégradation de la matière ligno-cellulosique par l'isolat bactérien (M4): A , cellulase ; C , hémicellulase ; E , laccase ; B , D et F , témoins.	66
Figure 12	Aspect morphologique de l'isolat (Alt) : A , observation macroscopique ; B , aspect microscopique (microscope optique X40).	68
Figure 13	Aspect morphologique de l'isolat (F1) : A et B Aspect macroscopique ; C et D , Aspect microscopique sous microscope à fluorescence X60 ; E , Aspect microscopique sous microscope optique (X40).	68
Figure 14	Activité antifongique de la souche bactérienne M4 par la technique de confrontation directe vis-à-vis des phytopathogènes : A , <i>F. napiforme</i> ; B , <i>A. alternata</i> (C et D , témoins).	70
Figure 15	Activité antifongique de l'isolat fongique (P2L) par la technique de confrontation directe vis-à-vis des phytopathogènes : A , <i>F. napiforme</i> ; B , <i>A. alternata</i> . (C et D , témoins).	71
Figure 16	Etude morphologique de l'isolat (M4) : A , aspect macroscopique ; B , Aspect microscopique sous microscope optique (X40) ; C , Aspect microscopique sous microscope à fluorescence (X60) ; D , test de sporulation.	72
Figure 17	Aspect morphologique de l'isolat (P2L) : A et B , observation macroscopique ; C et D , aspect microscopique (microscope optique X40).	73
Figure 18	Courbe de croissance de <i>B. halotolerans</i> .1 : 1 : Phase de latence ; 2 : Phase exponentielle ; 3 : Phase de ralentissement ; 4 : Phase stationnaire ; 5 : Phase de déclin.	77
Figure 19	Activité antifongique de <i>B. halotolerans</i> vis-à-vis de : A , <i>F. napiforme</i> ; B , <i>A. alternata</i> en utilisant le surnageant de culture (Milieu LB).	78
Figure 20	Activité antifongique de <i>B. halotolerans</i> vis-à-vis de : A , <i>F. napiforme</i> ; B , <i>A. alternata</i> en utilisant le surnageant de culture (Milieu avoine).	79

Figure 21	Relation entre la concentration du substrat (g) et la température (°C) sur l'activité antagoniste (mm).	83
Figure 22	Relation entre la température (C°) et le temps d'incubation (h) sur l'activité antagoniste (mm).	84
Figure 23	Relation entre la concentration de substrat et le temps d'incubation (h) sur l'activité antagoniste (mm).	84
Figure 24	Relation entre pH et le temps d'incubation (h) sur l'activité antagoniste (mm).	85
Figure 25	Relation entre le pH et la température sur l'activité antagoniste (mm).	85
Figure 26	Relation entre le pH et la concentration du substrat sur l'activité antagoniste (mm).	86
Figure 27	Test de pathogénicité : A et B , plants de tomates infectés par <i>F. napiforme</i> ; C , plants de tomate témoin.	89
Figure 28	Test de pathogénicité : A et B , Feuilles infectées par <i>A. alternata</i> ; C , Feuilles témoin (Non infectées par <i>A. Alternata</i>).	89
Figure 29	Ré-isolement du phytopathogène <i>F. napiforme</i> .	90
Figure 30	Ré-isolement du phytopathogène <i>A. alternata</i> .	91
Figure 31	A et B , effet antagoniste de <i>B. halotolerans</i> contre le phytopathogène <i>F. napiforme</i> ; C , témoin ; D , comparaison de la masse racinaire. Après 3 semaines d'incubation dans les conditions de pots (Milieu LB).	92
Figure 32	A et B , effet antagoniste de <i>B. halotolerans</i> contre le phytopathogène <i>F. napiforme</i> ; C , témoin ; D , comparaison de la masse racinaire. Après 3 semaines d'incubation dans les conditions de pots (Milieu MA).	93
Figure 33	Effet antagoniste de <i>B. halotolerans</i> inoculé sur milieu MA sur la protection des plantes de tomate « variété Louiza » contre le phytopathogène <i>F. napiforme</i> . (A) Lot traité par <i>B. halotolerans</i> , (B) Lot témoin infecté par <i>F. napiforme</i> . (C) À gauche la masse racinaire des plantes du lot traité ; à droite la masse racinaire du Lot témoin (B) à la fin de culture.	94
Figure 34	Effet antagoniste de <i>B. halotolerans</i> inoculé sur milieu LB sur la protection des plantes de tomate « variété Louiza » contre le phytopathogène <i>F. napiforme</i> . (A) Lot traité par <i>B. halotolerans</i> , (B) Lot témoin infecté par <i>F. napiforme</i> . (C) À gauche la masse racinaire des plantes du lot traité ; à droite la masse racinaire du Lot témoin (B) à la fin de culture.	96
Figure 35	Tomates qui ont poussé après 12 semaines d'incubation	98
Figure 36	Évaluation de l'effet antagoniste de <i>B. halotolerans vis-à-vis</i> de <i>F. napiforme</i> par microscopie à épifluorescence (X60).	99
Figure 37	Profils UPLC de production des lipopetides par <i>B. halotolerans</i> sur milieu LB (A) et milieu MA (B).	100
Figure 38	Chromatogrammes correspondant aux surfactines produits par <i>B. halotolerans</i> sur milieu MA analysés par UPLC/MS.	101

Figure 39	Chromatogrammes correspondant aux surfactines produits par <i>B. halotolerans</i> sur milieu LB analysés par UPLC/MS.	101
Figure 40	Superposition des chromatogrammes correspondant aux surfactines produits par <i>B. halotolerans</i> ; (A–) : sur milieu MA (Avoine comme seule source de carbone), (B–) : sur milieu LB analysé par UPLC/MS.	101
Figure 41	Spectres de masse des analogues de surfactine identifiés dans le surnageant de <i>B. halotolerans</i> à l'aide de UPLC-MS.	102
Figure 42	Activité PGPR par <i>B. halotolerans</i> : A , fixation d'azote ; B , production d'amylase ; C , production de caséinase ; D , production de HCN ; E , production de NH ₃ ; F , production de l'IAA ; G , production des siderophores ; H , production de biosurfactant.	104

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Exemples de microorganismes dégradant la matière ligno-cellulosique.	9
Tableau 2 : Classification de la tomate.	12
Tableau 3 : Amorces utilisées pour la caractérisation moléculaire.	44
Tableau 4 : Variables à différents niveaux.	52
Tableau 5 : Matrice de Box-Behnken.	52
Tableau 6 : Paramètres adoptés pour la création du modèle ANN.	55
Tableau 7 : Isolats obtenus à partir de différents échantillons.	63
Tableau 8 : Isolats dégradant la biomasse ligno-cellulosique	64
Tableau 9 : Séquences <i>ITS rDNA</i> (<i>Alternaria sp.</i> et <i>Fusarium sp.</i>).	69
Tableau 10 : Séquence du gène ribosomal <i>RNA-16S</i> .	74
Tableau 11 : Analyse du sol.	75
Tableau 12 : Analyse des variances (ANOVA).	82
Tableau 13 : Configuration des facteurs avec les valeurs de réponse prédites et expérimentales.	88
Tableau 14 : Comparaison entre l'effet de <i>B. halotolerans</i> (Milieu MA) et <i>B. halotolerans</i> (Milieu LB) sur les plants de tomates contre le phytopathogène <i>F. napiforme</i> après 3 semaines d'incubation.	93
Tableau 15 : Effet de <i>B. halotolerans</i> (Milieu MA) sur les plants de tomates contre le phytopathogène <i>F. napiforme</i> après 4, 8 et 12 semaines d'incubation en plein champ.	95
Tableau 16 : Effet de <i>B. halotolerans</i> (Milieu LB) sur les plants de tomates contre le phytopathogène <i>F. napiforme</i> après 4, 8 et 12 semaines d'incubation en plein champ.	97
Tableau 17 : Comparaison entre l'effet de <i>B. halotolerans</i> (Milieu MA) et <i>B. halotolerans</i> (Milieu LB) sur les plants de tomate contre le phytopathogène <i>F. napiforme</i> après 12 semaines d'incubation en plein champ.	98

LISTE DES ABREVIATIONS.

ACN	Acétonitrile
ADN	Acide désoxyribonucléique
AG	Algorithmes Génétiques
ANN	Réseau de neurones artificiels
BBD	Box-Behnken Design
CMC	Carboxy Méthyl Cellulose
DNTP	Désoxyribonucléoside (A, C,G,T) triphosphate
FAO	Food and Agriculture Organization
FEN	Fengycine
HCN	Cyanur d'hydrogène
IA	Intelligence artificielle
ITS	Espaceur interne transcrit des gènes d'ADNr (Internal Transcribed Spacer)
LB	Luria-Bertani
LMBG	Lignin Medium Basic Gaïacol
LPs	Lipopeptides
MA	Milieu Avoine
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NH ₃	Ammoniac
NRPS	Synthétases peptidiques non ribosomiques
PCP	Protéine porteuse peptidique
PCR	Réaction de polymérisation en chaîne
PDA	Potato Dextrose Agar
PGPR	Plant Growth Promoting Rhizobacteria
PKS	Synthétases hybrides NRPS-polyketide
R ²	Coefficient de corrélation
SQMD	Single Quadrupole Mass Detection
UPLC/MS	Chromatographie liquide à haute performance couplé à un spectromètre de masse à une dimension
XMB	Xylene Medium Basic

TABLE DES MATIERES

DEDICACES	i
REMERCIEMENTS	ii
LISTE DES FIGURES	iii
LISTE DES TABLEAUX	vi
LISTE DES ABREVIATIONS	vii
1- INTRODUCTION	1
2- REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	4
2.1- Biomasse ligno-cellulosique	4
2.1.1- Cellulose	4
2.1.2- Hémicellulose	5
2.1.3- Lignine	5
2.1.4- Sources de biomasse ligno-cellulosique	6
2.1.4.1- Les résidus agricoles	6
2.1.4.2- Les déchets forestiers	6
2.1.4.3- Les cultures énergétiques dédiées	7
2.1.4.4- Résidus de cultures non alimentaires	7
2.1.5- Valorisation et applications de la biomasse ligno-cellulosique	7
2.1.6- Microorganismes dégradant la biomasse ligno-cellulosique.	8
2.1.6.1- Les bactéries cellulolytiques	8
2.1.6.2- Les champignons lignolytiques	8
2.1.6.3- Les levures cellulolytiques	8
2.1.6.4- Les actinomycètes	8
2.1.7- Impact environnemental de la biomasse ligno-cellulosique.	9
2.1.8- Isolement et caractérisation des microorganismes dans l'écosystème forestier	10
2.1.8.1- Le bois mort	10
2.1.8.2- Le sol forestier	10
2.1.8.3- Débris ligneux en décomposition	10
2.2- Bio-contrôle : approches et applications	11
2.2.1- Culture cible : Tomates	11
2.2.1.1- Généralités	11
2.2.1.2- Variétés des tomates	12
2.2.1.2.1- Variété à croissance déterminée	12
2.2.1.2.2- Variétés à croissance indéterminée	13
2.2.1.2.3- Variété à croissance semi-déterminée	14
2.2.2- Importance de la culture de tomates dans le contexte du bio-contrôle	14
2.2.3- Maladies de la tomate	16
2.2.3.1- Fusariose de la tomate	16
2.2.3.2 - Le genre <i>Fusarium</i>	16
2.2.3.3- <i>Fusarium napiforme</i>	17
2.2.3.4- Alternariose de la tomate	18
2.2.3.5- Le genre <i>Alternaria</i>	18
2.2.3.6- <i>Alternaria alternata</i>	19

2.3- Rôle des microorganismes dans le domaine du bio-contrôle	19
2.3.1- Le genre <i>Chaetomium</i>	20
2.3.2- Le genre <i>Bacillus</i>	21
2.3.2.1- <i>Bacillus halotolerans</i>	21
2.3.2.2- Mode d'action des microorganismes contre les pathogènes	22
2.4- Fermentation	23
2.4.1- Conditions de fermentation	24
2.4.2- Types de fermentation	24
2.4.2.1- Fermentation solide	24
2.4.2.2- Fermentation liquide	24
2.5- Substrat de fermentation : Paille d'avoine	25
2.5.1- Description de la plante	26
2.5.2- Disponibilité en Algérie	27
2.5.3- La paille d'avoine comme substrat de fermentation	27
2.6- Modélisation	28
2.6.1- Plan de Box-Benken	28
2.6.2- Méthode des surfaces de réponse (RSM)	29
2.6.3- Réseaux de neurones artificiels (ANNs)	30
2.7- Lipopeptides	32
2.7.1- Les surfactines	33
2.7.2- Les fengycines	34
2.7.3- Les iturines.	35
2.8- Étude des mécanismes de biocontrôle contre les pathogènes végétaux par microscopie épifluorescente	36
2.9- Molécules à effet PGPR	37
3. MATERIEL ET METHODES	40
3.1- Isolement des microorganismes à partir d'échantillon riche en matière ligno-cellulosique	40
3.2- Sélection des microorganismes dégradant la matière ligno-cellulosique	41
3.3- Sélection des microorganismes développant des potentialités de biocontrôle	42
3.3.1- Isolement des agents pathogènes infectant la tomate	42
3.3.2- Identification des agents pathogènes infectant la tomate	42
3.3.2.1- Examen macroscopique	42
3.3.2.1- Examen microscopique	43
3.3.2.2- Identification moléculaire	43
3.3.3- Sélection des isolats antagonistes : Test d'antagonisme <i>in vitro</i>	44
3.3.4- Identifications des isolats antagonistes sélectionnés	45
3.3.4.1- Identification morphologique de l'isolat (M4)	45
3.3.4.2- Identification morphologique de l'isolat (P2L)	46
3.3.4.3- Identification moléculaire des isolats sélectionnés	46
3.3.5- Etude de l'isolat bactérien sélectionné	47
3.3.5.1- Etude pédologiques et climatologique	48
3.3.5.2- Caractérisation de l'isolat bactérien sélectionné	48
3.3.5.2.1- Courbe de croissance	48

3.3.5.2.2- Tolérance au sel, à la température et au pH	48
3.3.6- Etude de l'activité antagoniste de <i>B. halotolerans in vitro</i> en utilisant les surnageants de culture	49
3.3.7- Modélisation	50
3.3.7.1-Optimisation des facteurs physico-chimiques influant l'activité antagoniste de <i>B. halotolerans</i> à l'aide du plan de Box-Behnken (PBD)	50
3.3.7.2- Plan de Box-Behnken (PBB) et méthode des surfaces de réponses (RSM)	52
3.3.7.3- Modélisation à l'aide du système ANNs couplé à un algorithme génétique (GA)	53
3.3.7.4- Validation expérimentales des modèles (BBD- RSM) et (ANNs-GA)	56
3.3.8- Application <i>in vivo</i> de la souche bactérienne sélectionnée comme agent de biocontrôle	56
3.3.8.1- Test de pathogénicité	56
3.3.8.2- Test d'antagonisme <i>in vivo</i> en conditions de pots	57
3.3.8.3- Test d'antagonisme <i>in vivo</i> en plein champ	58
3.3.8.4- Etude statistique	59
3.3.9- Évaluation de l'effet antagoniste de la bactérie sélectionnée <i>vis-à-vis</i> de <i>Fusarium</i> (F1) par microscopie à épifluorescence	59
3.3.10 - Extraction, séparation et analyse des lipopeptides par UPLC/MS	59
3.3.11- Activité PGPR <i>in vitro</i>	60
3.3.11.1- Fixation d'azote	60
3.3.11.2- Production d'amylase	60
3.3.11.3- Production de protéase	61
3.3.11.4- Production du HCN	61
3.3.11.5- Production de NH ₃	61
3.3.11.6- Production d'Acide Indole Acétique (AIA)	61
3.3.11.7- Production des sidérophores	61
3.3.11.8- Production de biosurfactant	62
4. RESULTATS	63
4.1- Isolement des microorganismes à partir d'échantillon riche en matière ligno-cellulosique	63
4.2- Sélection des microorganismes dégradant la matière ligno- cellulosique	64
4.3-Sélection des microorganismes développant des potentialités de biocontrôle	67
4.3.1- Isolement et identification des agents pathogènes infectant la tomate	67
4.3.1.1- Examen macroscopique	67
4.3.1.2- Examen microscopique	67
4.3.1.3- Identification moléculaire	69
4.4- Sélection des isolats antagonistes : Test d'antagonisme <i>in vitro</i>	69
4.5- Identifications des isolats antagonistes sélectionnées (M4) et (P2L)	71
4.5.1- Identification morphologique de l'isolat (M4)	71
4.5.2- Identification morphologique de l'isolat (P2L)	73
4.5.3- Identification moléculaire des isolats sélectionnés	74

4.6- Étude de la bactérie <i>B. halotolerans</i> isolée du sol autour de l'arbre de pin	75
4.6.1-Eude pédologiques du sol	75
4.6.2-Etude climatologique de site de prélèvement	76
4.6.3- Caractérisation de <i>B. halotolerans</i>	76
4.6.3.1- Courbe de croissance de <i>B. halotolerans</i>	76
4.6.3.2- Tolérance au sel, à la température et au pH	77
4.7- Etude de l'activité antagoniste de <i>B. halotolerans in vitro</i> en utilisant les surnageants de culture	78
4.8- Modélisation	79
4.8.1- Optimisation des facteurs physico-chimiques influents l'activité antagoniste de <i>B. halotolerans</i> à l'aide du plan de Box-Behnken (BBD) et de la méthode des surfaces de réponse (RSM)	79
4.8.2- Modélisation à l'aide du système ANNs couplé à un algorithme génétique (GA)	86
4.8.3- Validation expérimentales des modèles	87
4.9- Application de la souche bactérienne sélectionnée comme agent de biocontrôle	88
4.9.1- Test de pathogénicité	88
4.9.2- Test <i>in vivo</i>	91
4.9.2.1- Conditions de pots	91
4.9.2.2- Tests <i>in vivo</i> en conditions de champ	94
4.9.2.2.1- Effet de <i>B. halotolerans</i> préalablement cultivé sur le milieu MA	94
4.9.2.2.2- Effet de <i>B. halotolerans</i> préalablement cultivé sur le milieu LB	95
4.10- Évaluation de l'effet antagoniste de <i>B. halotolerans vis-à-vis</i> de <i>F. napiforme</i> par microscopie à épifluorescence	99
4.11- Analyse des Lipopeptides par UPLC/MS	100
4.12- Activité PGPR	103
5- Discussion	105
6- Conclusion et perspectives	118
7- Abstract	122
8- الملخص	123
9- Références bibliographiques	124
10- Annexes	

Introduction

1. Introduction

La biomasse ligno-cellulosique, une ressource renouvelable et abondante, joue un rôle crucial dans notre environnement. Elle est reconnue comme l'une des sources les moins coûteuses et les plus influentes. Cette matière première représente un potentiel considérable pour diverses applications, notamment dans le domaine de l'énergie et des matériaux (O'donohue et Dbeire, 2006 ; De Farias *et al.*, 2021). La biomasse ligno-cellulosique représente environ 90% du poids sec de la matière végétale. Ce matériau complexe est composé de trois polymères principaux : la cellulose, l'hémicellulose et la lignine (Kumaret *al.*, 2009 ; Fatma *et al.*, 2018). Par ailleurs, la valorisation de la biomasse ligno-cellulosique est très complexe et confrontée à des défis techniques et économiques. L'intégration des microorganismes à plusieurs niveaux, notamment dans les processus d'hydrolyse et de fermentation, s'avère être une étape importante du processus de valorisation. En effet, diverses études ont démontré que la décomposition de la biomasse ligno-cellulosique peut être réalisée grâce à l'action de différents micro-organismes, comprenant une variété de genres fongiques et bactériens. Ces micro-organismes qui produisent des enzymes cellulolytiques et hémicellulolytiques, agissent aussi bien dans des environnements aérobies qu'anaérobies (Kumar *et al.*, 2008 ; Wongwilaiwalin *et al.*, 2010 ; Chukwuma *et al.*, 2020). Sur un autre aspect, l'agriculture moderne vise à produire des aliments de qualité tout en adoptant des méthodes respectueuses de l'environnement et efficaces. L'utilisation de certains produits chimiques, tels que les pesticides, tend à être réduite en raison de leurs effets néfastes sur l'environnement. Ainsi, l'utilisation d'agents de biocontrôle dans la lutte biologique est considérée comme une approche plus durable, limitant les résidus nocifs dans la chaîne alimentaire. Cela dépend du degré de protection conféré par les organismes antagonistes contre les agents pathogènes des plantes (Abo-Elyousr *et al.*, 2019).

En effet, les microorganismes naturellement présents dans la rhizosphère du sol peuvent avoir un impact positif sur la croissance des plantes et influencer la disponibilité des éléments nutritifs (Van der Heiden *et al.*, 2008). Les bactéries appartenant aux genres *Bacillus* et *Pseudomonas* représentent entre 2 et 5% des bactéries présentes dans la rhizosphère. Ces microorganismes peuvent procurer aux plantes, une protection contre les agents pathogènes en développant des mécanismes de défense (Ahmed *et al.*, 2008).

La tomate, de la famille des Solanales (Solanaceae) et en particulier l'espèce *Solanum lycopersicum L.* occupe une place de choix parmi les cultures maraîchères mondiales.

Cultivée sur une superficie de 5,17 millions d'hectares, elle a généré une production totale de 189 millions de tonnes et un rendement moyen de 36,6 tonnes par hectare (FAOSTAT,2023).

En Algérie, la tomate joue un rôle essentiel dans l'économie agricole, elle est considérée comme l'une des cultures prioritaires. En 2018, la superficie consacrée à sa culture dépassait les 22 mille hectares, avec un rendement avoisinant les 5,87 tonnes par hectare, ce qui représente une production dépassant un (1) million de tonnes dans le pays (FAO, 2020). Le nombre d'agents pathogènes affectant la tomate est très élevé. Parmi les champignons responsables des infections de la tomate, on peut citer : *Alternaria solani*, *Botrytis cinerea* et *Fusarium oxysporum*. (Panno *et al.*, 2021). Les maladies les plus courantes de la tomate incluent les fusarioses et les alternarioses, dont les symptômes et la gravité varient considérablement. En effet, la fusariose provoque la pourriture des racines ou des tiges, des chancres, des flétrissements, pouvant conduire à la mort des plantes (Benlamoudi *et al.*,2019). Quant à l'alternariose, elle affecte tous les organes aériens de la tomate à chaque étape de sa croissance.

Le travail que nous avons réalisé dans le cadre de cette thèse, s'inscrit dans les deux domaines décrit ci-dessus ; à savoir : ¹la valorisation de la matière ligno-cellulosique, et ²l'utilisation des microorganismes comme agent de biocontrôle et fertilisation. En effet, dans notre cas, les microorganismes testés ont été isolés à partir du sol du voisinage de l'arbre de pin, situé à l'Est de l'Algérie (Constantine) et à partir des coques de noix et d'amandes ; le but étant d'une part, de les utiliser comme agents dégradant la biomasse ligno-cellulosique et d'autre part comme agents de biocontrôle pour améliorer le rendement des récoltes, tout en respectant l'environnement, la santé humaine et animale. L'accent est mis sur les maladies spécifiques de la tomate, principalement provoquées par les moisissures *Fusarium napiforme* et *Alternaria alternata*, en raison des dégâts récents observés sur les cultures locales. La paille d'avoine a été sélectionnée comme substrat de fermentation pour la production de substances bioactives par la bactérie *B. halotolerans*. Ce choix est motivé par sa richesse en biomasse ligno-cellulosique, reconnue pour sa résistance à la dégradation, ainsi que par sa disponibilité étendue en Algérie.

Dans un souci de clarté, la thèse est structurée en quatre parties. La première partie porte sur une revue de la littérature à travers laquelle une mise au point sur le sujet traité, a été faite, incluant ainsi l'état des connaissances sur la biomasse ligno-cellulosique, l'avoine, le biocontrôle ; les lipopeptides. En parallèle, une autre partie a été consacrée à la description botanique de la tomate, sa culture, les différentes variétés de ce fruit, tout en mettant un accent

particulier, sur les maladies qui l'affectent. La seconde partie constitue un descriptif de toutes les approches expérimentales adoptées que ce soit *in vitro* ou *in vivo*. Une description du site d'échantillonnage a été abordée, puis le mode de sélection des microorganismes susceptibles de dégrader la matière ligno-cellulosique, des microorganismes développant des potentialités de biocontrôle a été exposé. Dans cette même partie, les approches adoptées d'une part, pour caractériser et identifier les isolats sélectionnés et, d'autre part, pour leur application comme agent de biocontrôle ont été présentées. Toutes les méthodes statistiques et mathématiques de modélisation utilisées pour analyser les résultats expérimentaux obtenus ont été détaillées.

Dans la troisième partie, l'ensemble des résultats expérimentaux obtenus dans le cadre de cette thèse, sont regroupés. En effet, les résultats de l'isolement, de la purification et des identifications morphologiques et moléculaires, ainsi que ceux de la caractérisation des microorganismes les plus performants dans la dégradation de la biomasse ligno-cellulosique et dans l'inhibition des phytopathogènes sont présentés. Les résultats de l'étude *in vitro* de l'activité antagoniste de l'isolat le plus performant en utilisant les surnageants de culture issus de la culture de *Bacillus halotolerans* sur deux milieux de culture (MA), à base d'avoine comme seule source de carbone et (LB) milieu Luria-Bertani sont également exposés dans cette partie. De plus, les facteurs physico-chimiques qui influent sur l'activité antagoniste de l'isolat le plus performant à l'aide de deux modèles à savoir : le plan de Box-Behnken (BBD) avec la méthode des surfaces de réponses (RSM) et d'une approche basée sur un réseau de neurones artificiels (ANN : Artificial Neural Network) couplé à un algorithme génétique (GA) ont été optimisés. Cette partie est suivie par les résultats des tests *in vivo*, (Test de pathogénicité, et les tests d'antagonisme en conditions de pots et en plein champs), qui traitent l'effet des deux surnageants cités ci-dessus sur la promotion de la croissance et la diminution de la gravité de la maladie de la tomate causée par *F. napiforme*. Enfin, cette partie se conclut, par la présentation des résultats de l'observation microscopique à épifluorescence de l'interaction *B. halotolerans*-*F. napiforme*, de l'étude de la production des lipopeptides (UPLC-MS) et des molécules à effet PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria) par *B. halotolerans*.

Les résultats obtenus sont discutés et comparés à ceux de la littérature dans la quatrième partie. L'accent a été mis sur notre apport personnel dans ce domaine de recherche et sur les résultats qui nous ont semblés pertinents. Enfin, cette thèse est clôturée par une conclusion dans laquelle des constatations tirées des résultats les plus importants ont été mises en évidence ; et des perspectives futures ont été dévoilées.

Revue bibliographique

2- Revue bibliographique

2.1 – Biomasse ligno-cellulosique : Bref aperçu

La biomasse ligno-cellulosique est une source renouvelable et abondante qui influence l'environnement (De Farias *et al.*, 2021). Constituant 90% du poids sec de la matière végétale, ce matériau complexe est formé de trois polymères principaux : la cellulose, l'hémicellulose et la lignine (Kumar *et al.*, 2009 ; Fatma *et al.*, 2018). Ces polymères contribuent à créer une structure rigide grâce à la cristallinité de la cellulose, à l'hydrophobie de la lignine et à l'encapsulation de la cellulose dans le complexe Hém-lig (hémicellulose-lignine), ce qui confère aux plantes, une résistance aux attaques parasitaires (Malainine *et al.*, 2005).

2.1.1- Cellulose

La cellulose, qui est la macromolécule la plus abondante, est produite à une échelle annuelle d'environ $7,5 \times 10^{10}$ tonnes (Okolie *et al.*, 2021). Il s'agit d'un polymère extrêmement stable composé de 100 à 14 000 unités de glucose liées les unes aux autres par des liaisons glycosidiques β -1-4, formant ainsi une structure linéaire (Figure 1). Les extrémités hydroxyles contribuent à stabiliser la structure grâce à des liaisons hydrogène inter et intra-moléculaires solides, donnant lieu à une molécule fibreuse amphipathique (dotée d'une extrémité hydrophile et d'une extrémité hydrophobe) qui assure une stabilité thermique. La cellulose présente un poids moléculaire de 342,3 g/mol). Ses chaînes ont la capacité de s'associer pour former des microfibrilles. Certaines régions de ces chaînes sont désordonnées (zones amorphes) tandis que d'autres sont ordonnées (zones cristallines). Ces microfibrilles sont généralement indépendantes et se lient faiblement par des liaisons hydrogène (Laureano-Perez *et al.*, 2005 ; Abraham *et al.*, 2020 ; Woiciechowski *et al.*, 2020).

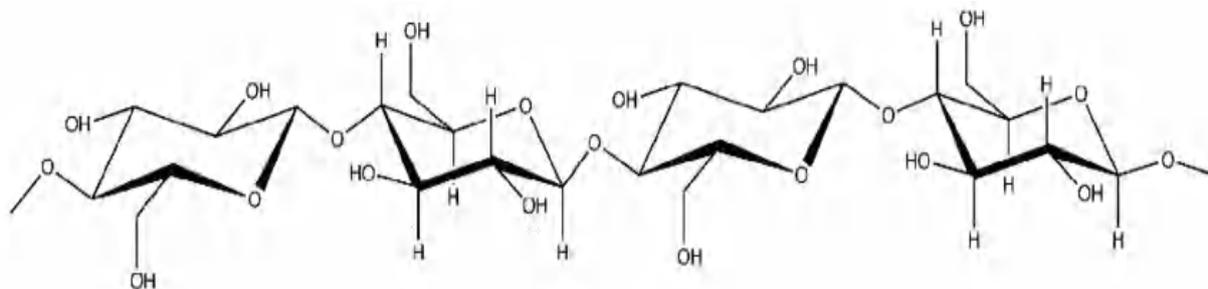


Figure 1 Structure de la cellulose (Hu *et al.*, 2020).

2.1.2- Hémicellulose

L'hémicellulose est un polymère hétérogène composé de chaînes plus courtes et facilement hydrolysable, constitué de pentoses, d'hexoses et d'acides (Figure 2), tels que le xylose, l'arabinose, le glucose, le mannose, le rhamnose, le galactose, l'acide galacturonique et l'acide glucuronique. Le poids moléculaire de l'hémicellulose est inférieur à celui de la cellulose (Abraham *et al.*, 2020). Le xyloglucan est une hémicellulose constituée de chaînes d'unités de glucose et de xylose, liées par des liaisons 1,4- β -D-glucopyranose et 1,6- α -D-xylopyranose, il est principalement composé de glucose, de xylose et d'arabinose dans des proportions respectives de 3:4:1, liées avec β -(1,4) D-glucopyranose. Le mannane, un polysaccharide formé d'unités de mannose liées entre elles par des liaisons β -(1,4), se décline en différents types, notamment le glucomannane (liant mannose et glucose avec des liaisons β -(1,4) dans un ratio de 1:3) et le galactomannane (où une unité de galactose est liée à la chaîne de mannose via un pont α -1,6) (Okolie *et al.*, 2021).

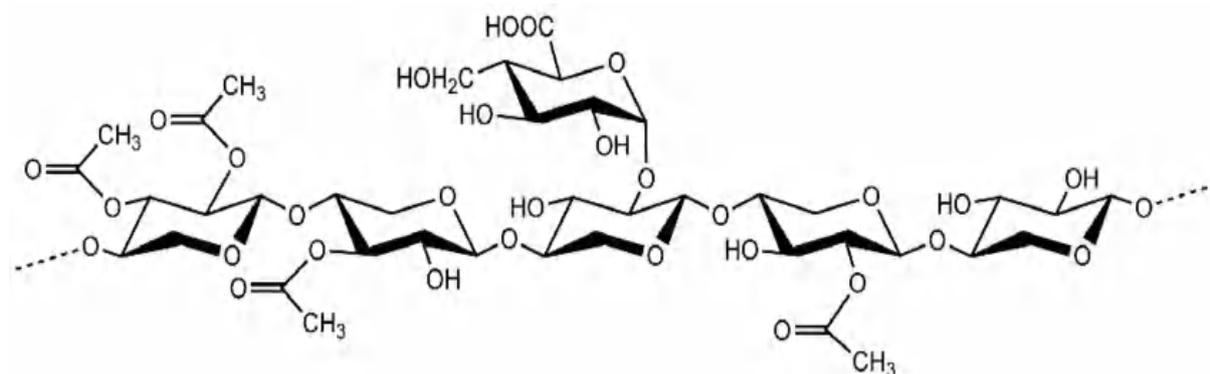


Figure 2 Structure de l'hémicellulose (Scheller *et al.*, 2010).

2.1.3- Lignine

La lignine se présente sous forme d'un polymère complexe tridimensionnel composé de différentes unités de propane phénoliques liées par des liaisons éther et des liaisons carbone-carbone. Trois alcools propioniques phénoliques sont les monomères constitutifs de la lignine (Figure 3) : l'alcool p-coumaryl, le coniferyl et le sinapyl. En raison de sa structure moléculaire, la lignine présente une extrême résistance à la dégradation chimique et enzymatique (Palmqvist *et al.*, 1999 ; Fatma *et al.*, 2018 ; Okolie *et al.*, 2021).

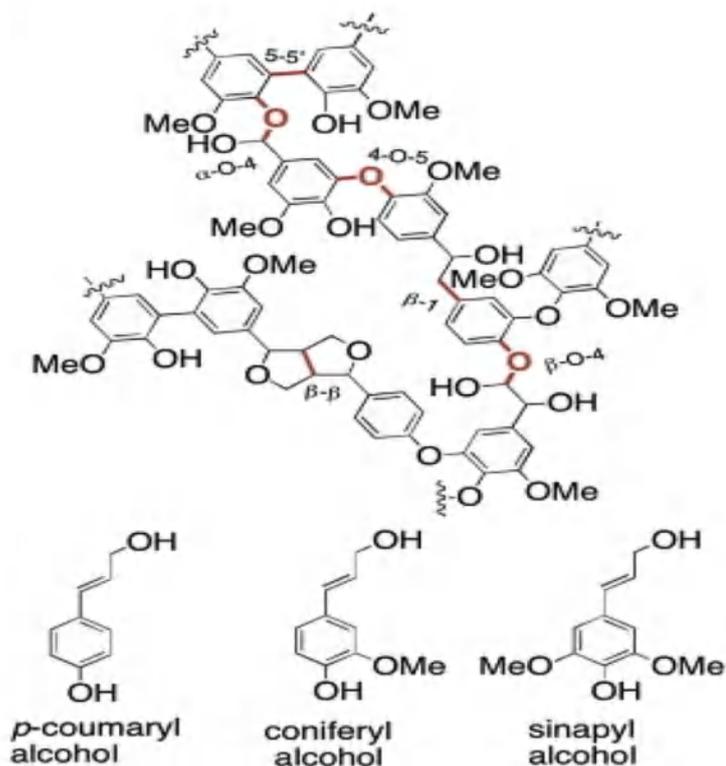


Figure 3 Structure de la lignine (Dai *et al.*, 2016).

2.1.4- Sources de biomasse ligno-cellulosique

La biomasse ligno-cellulosique est une ressource polyvalente et durable, essentielle dans la transition vers une économie plus circulaire et respectueuse de l'environnement (Sun *et al.*, 2012). Parmi les principales sources de biomasse ligno-cellulosique, on peut citer :

2.1.4.1- Les résidus agricoles : Ces matériaux sont issus de l'agriculture et comprennent notamment la paille de céréales (blé, riz, etc.), les tiges de maïs, les cannes à sucre et les coquilles de graines telles que celles de tournesol ou de soja. Ces résidus sont souvent abondants après la récolte et peuvent être collectés pour une utilisation ultérieure (Cherubini et Francesco, 2010).

2.1.4.2- Les déchets forestiers : Les déchets générés par l'exploitation forestière et la transformation du bois, tels que les branches, les écorces, les feuilles et les sous-produits comme les copeaux et les sciures, constituent une source importante de biomasse. Ces matériaux peuvent être collectés dans les forêts ou dans les installations de transformation du bois (Mohan *et al.*, 2006).

2.1.4.3- Les cultures énergétiques dédiées : Certaines plantes, telles que le miscanthus et le switchgrass, sont cultivées spécifiquement pour leur potentiel en tant que sources de biomasse. Ces cultures énergétiques peuvent être cultivées sur des terres non utilisées pour la production alimentaire et offrent un rendement élevé en biomasse par unité de surface (Himmel *et al.*, 2007).

2.1.4.4- Résidus de cultures non alimentaires : Outre les résidus agricoles, les cultures énergétiques et les déchets forestiers, d'autres résidus de cultures non alimentaires, tels que ceux provenant de la production de biocarburants ou de biomatériaux, peuvent également être valorisés pour leur contenu en cellulose, hémicellulose et lignine (Alvira *et al.*, 2010). En exploitant ces différentes sources de biomasse ligno-cellulosique de manière durable, il est possible de répondre aux besoins croissants en énergie, en matériaux et en produits chimiques biosourcés tout en réduisant l'empreinte environnementale associée aux combustibles fossiles et aux matériaux non renouvelables. (Wyman *et al.*, 2008 ; Himmel *et al.*, 2014).

2.1.5- Valorisation et applications de la biomasse ligno-cellulosique

Les avancées technologiques ont permis le développement de différentes méthodes de valorisation de la biomasse ligno-cellulosique, telles que la pyrolyse, la gazéification et la fermentation, qui permettent de convertir la biomasse en une variété de produits utiles, tels que le biogaz et les biocarburants (Himmel *et al.*, 2007 ; Ruiz *et al.*, 2013). Dans le secteur industriel, la biomasse ligno-cellulosique trouve de nombreuses applications, notamment dans la production d'énergie renouvelable, les matériaux de construction durables, les produits chimiques et les plastiques verts (Sun *et al.*, 2002 ; Perlack *et al.*, 2005). Les résidus agricoles, les déchets forestiers, les cultures énergétiques dédiées et les résidus de cultures non alimentaires sont autant de sources potentielles de biomasse ligno-cellulosique utilisées dans ces applications (Cherubini 2010 ; Ragauskas *et al.*, 2014). Les développements récents dans le domaine de la biomasse ligno-cellulosique ont permis de mettre en lumière de nouvelles possibilités de valorisation et d'innovation. Les progrès technologiques dans les domaines de la bio-raffinerie intégrée et de la biotechnologie, ouvrent de nouvelles voies pour la production durable de bioproduits à partir de la biomasse ligno-cellulosique (Gnansounou *et al.*, 2010 ; Demirbas *et al.*, 2009). Cependant, l'avenir de la biomasse ligno-cellulosique semble prometteur, avec de nombreuses opportunités pour contribuer à la transition vers une économie circulaire. De ce fait, la biomasse ligno-cellulosique représente un élément clé de la transition vers une économie plus durable et renouvelable. Avec les bonnes politiques, les

bonnes technologies et les bonnes pratiques, elle peut jouer un rôle crucial dans la construction d'un avenir plus vert et plus prospère pour tous (Farrell *et al.*, 2006).

2.1.6- Microorganismes dégradant la biomasse ligno-cellulosique

Les microorganismes dégradant la biomasse ligno-cellulosique jouent un rôle vital dans la décomposition des matières végétales riches en cellulose et en lignine, contribuant à la biodégradation, au cycle des éléments nutritifs et à la production industrielle (Lynd *et al.*, 2002). Plusieurs microorganismes sont impliqués dans la dégradation de la biomasse ligno-cellulosique, parmi lesquels on peut citer :

2.1.6.1- Les bactéries cellulolytiques : Ces microorganismes produisent une variété d'enzymes cellulolytiques qui catalysent la décomposition de la cellulose en sucres simples. Parmi eux, on trouve des genres tels que *Cellulomonas*, *Clostridium*, *Bacillus* et *Ruminococcus*. Ils sont particulièrement efficaces pour dégrader la cellulose présente dans les parois cellulaires des plantes (Lynd *et al.*, 2002).

2.1.6.2- Les champignons lignolytiques : Les champignons lignolytiques sont capables de dégrader la lignine qui est une composante complexe et résistante de la biomasse végétale. Des espèces telles que *Trametes versicolor* (champignon de pourriture blanche) et *Phanerochaete chrysosporium* (champignon de pourriture brune) sécrètent des enzymes telles que la laccase et la peroxydase, qui fragmentent la lignine en composés plus simples, facilitant ainsi sa décomposition (Ragauskas *et al.*, 2014).

2.1.6.3- Les levures cellulolytiques : Ces microorganismes, notamment *Saccharomyces cerevisiae* et *Pichia stipitis*, possèdent la capacité de fermenter les sucres issus de la dégradation de la cellulose et de l'hémicellulose pour produire de l'éthanol. Leur utilisation dans les processus de fermentation permet de valoriser les déchets de biomasse en biocarburants (Himmel *et al.*, 2007).

2.1.6.4- Les actinomycètes : Les actinomycètes, tels que *Streptomyces* et *Actinomyces*, sont également impliqués dans la décomposition de la biomasse ligno-cellulosique. Ils produisent une gamme variée d'enzymes cellulolytiques, contribuant ainsi à la dégradation des composants structurels des plantes. Ensemble, ces microorganismes forment un écosystème complexe et interconnecté qui assure la décomposition efficace de la biomasse ligno-

cellulosique, fournissant ainsi des nutriments essentiels pour les écosystèmes terrestres et des matériaux précieux pour l'industrie (Martinez *et al.*, 2009).

Le tableau 1 illustre quelques espèces microbiennes impliquées dans la dégradation de la matière ligno-cellulosiques

Tableau 1 Exemples de microorganismes dégradant la matière ligno-cellulosique

Microorganismes	Matière ligno-cellulosiques	Enzymes	Références
<i>Bacillus subtilis</i>	Cellulose	Cellulase	(Kuhad <i>et al.</i> , 2010)
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Cellulose	Cellulase	(Kuhad <i>et al.</i> , 2010)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Lignine	Laccase	(Kong <i>et al.</i> , 2010)
<i>Chaetomium cellulolyticum</i>	Cellulose	Cellulase	(Kuhad <i>et al.</i> , 2010)
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Lignine	Laccase	(Jadhav <i>et al.</i> , 2010)
<i>Aspergillus niger</i>	Cellulose	Cellulase	(kuhad <i>et al.</i> , 2010)
<i>Streptomyces viridosporus</i>	Lignine	Laccase	(Lee <i>et al.</i> , 2012)
<i>Pichia stipitis</i>	Hémicellulose	Hémicellulase	(Sanchez <i>et al.</i> , 2013)
<i>Bacillus cereus</i>	Lignine	Laccase	(Viswanath <i>et al.</i> , 2014)
<i>Bacillus cereus</i>	Hémicellulose	Hémicellulase	(Abu-Gharbia <i>et al.</i> , 2017)
<i>Trichoderma reesei</i>	Cellulose	Cellulase	(Haroon <i>et al.</i> , 2018)
<i>Pseudomonas putida</i>	Lignine	Laccase	(Arias-Mejias <i>et al.</i> , 2019)
<i>Clostridium thermocellum</i>	Cellulose	Cellulase	(Xu <i>et al.</i> , 2019)
<i>Cellulomonas fimi</i>	Cellulose	Cellulase	(Choudhary <i>et al.</i> , 2020)
<i>Candida tropicalis</i>	Hémicellulose	Hémicellulase	(Zhang <i>et al.</i> , 2020)
<i>Trichoderma reesei</i>	Hémicellulose	Hémicellulase	(Mhatre <i>et al.</i> , 2022)
<i>Bacillus pumilis</i>	Hémicellulose	Hémicellulase	(Mhatre <i>et al.</i> , 2022)

2.1.7- Impact environnemental de la biomasse ligno-cellulosique

La biomasse ligno-cellulosique, une ressource naturelle abondante et renouvelable, suscite un intérêt croissant en tant que source potentielle d'énergie renouvelable et de matières premières durables (Ragauskas *et al.*, 2006). Toutefois, l'utilisation de la biomasse ligno-cellulosique offre de nombreux avantages économiques et environnementaux, elle peut également avoir des répercussions significatives sur l'environnement, tant positives que négatives (Patra *et al.*, 2018). Parmi les impacts négatifs potentiels, on peut citer la déforestation et la perte d'habitat pour de nombreuses espèces animales et végétales, ainsi que la conversion de terres agricoles précieuses en plantations de biomasse (Smith *et al.*, 2013). De plus, la production intensive de biomasse ligno-cellulosique peut entraîner une surexploitation des ressources naturelles, une consommation accrue d'eau et une pollution des sols et des eaux par les produits chimiques agricoles et les déchets organiques (Patra *et al.*, 2018). Par conséquent, il est impératif d'évaluer attentivement l'ensemble des répercussions

environnementales de l'utilisation de la biomasse ligno-cellulosique et de mettre en place des pratiques durables pour minimiser ces impacts. Cela comprend la promotion de pratiques de gestion forestière durable, la préservation des habitats naturels sensibles et la mise en place de mesures pour prévenir la pollution et la dégradation des écosystèmes (Cherubini *et al.*, 2009 ; Smith *et al.*, 2013).

2.1.8- Isolement et caractérisation des microorganismes dans l'écosystème forestier

L'isolement des microorganismes dégradant la matière ligno-cellulosique à partir du bois et du sol, est réalisé dans les écosystèmes forestiers, où le bois mort et la litière végétale sont abondants.

2.1.8.1- Le bois mort

Le bois mort, qu'il soit tombé au sol ou présent dans des arbres morts debout, il constitue un habitat idéal pour les microorganismes dégradant la matière ligno-cellulosique. Ces microorganismes peuvent coloniser le bois mort et commencer le processus de décomposition en le dégradant progressivement (Mohan *et al.*, 2006).

2.1.8.2- Le sol forestier

Le sol forestier est également riche en matière organique décomposable, y compris les débris végétaux, les feuilles mortes et les racines en décomposition. Les microorganismes ligno-cellulosiques se trouvent dans la couche supérieure du sol, où ils sont en contact étroit avec la matière organique en décomposition (Gobat *et al.*, 1998).

2.1.8.3- Débris ligneux en décomposition

En plus du bois mort, les débris ligneux en décomposition tels que les brindilles, les branches et les écorces peuvent également servir de substrat pour les microorganismes dégradant la matière ligno-cellulosique. Ces débris fournissent une source continue de carbone et d'énergie pour les microorganismes (Mohan *et al.*, 2006). L'isolement des microorganismes à partir de ces lieux, implique généralement la collecte d'échantillons de bois et de sol, suivie d'une série de techniques de laboratoire pour isoler et caractériser les microorganismes présents. Ces études permettent de mieux comprendre la diversité microbienne dans les écosystèmes forestiers et les rôles importants que ces microorganismes jouent dans le cycle du carbone et la décomposition de la matière organique (Smith *et al.*, 2013).

La caractérisation des microorganismes dans les écosystèmes forestiers revêt une importance cruciale pour comprendre leur rôle dans le fonctionnement de ces écosystèmes. Les microorganismes forestiers comprennent une grande diversité de bactéries, de champignons, de protozoaires et d'autres organismes, qui interagissent de manière complexe avec les plantes, le sol et les autres composantes de l'écosystème. Les techniques de caractérisation, telles que la microscopie, la culture en milieu spécifique, l'analyse génétique par PCR et séquençage, ainsi que des méthodes biochimiques, sont utilisées pour identifier et comprendre la diversité microbienne dans les sols forestiers, les litières, les racines des arbres et d'autres habitats forestiers. Cette caractérisation permet d'étudier les interactions symbiotiques entre les microorganismes et les plantes, la décomposition de la matière organique, le cycle des éléments nutritifs, la régulation des maladies des plantes et d'autres processus clés dans les écosystèmes forestiers. En synthèse, la caractérisation des microorganismes dans les écosystèmes forestiers est essentielle pour éclairer la gestion durable des forêts, la conservation de la biodiversité et le développement de pratiques de restauration écologique (Bardgett et Putten, 2014)

2.2- Bio-contrôle : approches et applications

L'utilisation de microorganismes dans le domaine du bio-contrôle représente une approche prometteuse pour la gestion durable des ravageurs et des maladies des cultures (Gopal *et al.*, 2013). Contrairement aux produits chimiques synthétiques, les agents de bio-contrôle sont dérivés de microorganismes tels que les levures, les bactéries, les champignons et les virus, qui agissent de manière spécifique et sélective contre les organismes nuisibles tout en préservant l'environnement et la santé humaine (Kim *et al.*, 2017). Cette approche repose sur la capacité des microorganismes à coloniser et à interagir avec les organismes pathogènes, souvent en inhibant leur croissance ou en induisant des mécanismes de défense chez la plante hôte (Witzel *et al.*, 2018).

2.2.1- Culture cible : Tomates

2.2.1.1- Généralités

La tomate, une plante maraîchère annuelle de la famille des Solanacées, présente une taille variant de 40 cm à plus de 5 mètres en fonction des variétés et des méthodes de culture (Blancard *et al.*, 2009). Ses feuilles alternes sont composées, tandis que les fleurs des variétés cultivées se regroupent en inflorescences simples ou ramifiées, avec un nombre variable allant de 5 à 12. Les fruits, quant à eux, sont des baies à loges, charnus, tendres, lisses ou présentant des sillons. Les graines se trouvent dans le mucilage contenu dans les loges (Bernard *et al.*,

2009). Diverses catégories et variétés de tomates se distinguent selon le mode de croissance de la plante (déterminée ou indéterminée) ainsi que la morphologie du fruit : plat et côtelé, arrondi, allongé avec une extrémité arrondie, de petite taille et de faible poids (Coll, 2006).

D'après Blancard *et al.* (2009), plusieurs caractéristiques permettent de distinguer les différentes variétés de tomates. La tomate (*S. lycopersicum*) est native d'Amérique du Sud, dans une région s'étendant du sud de la Colombie jusqu'au nord du Chili, et incluant les îles Galapagos (Shankara *et al.*, 2005). Elle a été initialement cultivée et améliorée par les peuples indigènes du Mexique (Bénaed, 2009), où neuf espèces ont été observées, dont deux sont comestibles : *Solanum pimpinellifolium* (tomate groseille) et *Solanum lycopersicum var cerasiforme* (tomate cerise). Elle a ensuite été introduite en Europe avant même la pomme de terre, le topinambour, le maïs et le tabac (Shankara *et al.*, 2005). Les Italiens ont été les premiers à la consommer au 16^{ème} siècle (Schumann, 1996). La classification de la tomate est exposée dans le tableau 2.

Tableau 2 Classification de la tomate. (Dupont et Guignard, 2012).

Règne	Plantae
Sous règne	Trachenobionta
Division	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Sous classe	Asteridae
Ordre	Solanales
Famille	Solanaceae
Genre	<i>Solanum</i> ou <i>Lycopersicon</i>
Espèce	<i>Lycopersicum esculentum</i> Mill

2.2.1.2- Variétés des tomates

2.2.1.2.1- Variété à croissance déterminée

Ce groupe comprend des variétés où la tige émet un nombre préétabli de bouquets à fleurs. La tige principale se termine par un bouquet à fleurs, de même que les rameaux anticipés, ce qui entraîne l'arrêt naturel de la croissance de la tige en l'absence de bourgeon végétatif terminal (Laumonnier, 1979). La croissance végétative se poursuit jusqu'à ce que les extrémités des tiges ne produisent plus que des fleurs, rendant ainsi tout allongement impossible (Figure 4). Le nombre d'inflorescences est limité. Ces plants de tomate ont un port buissonnant et compact (en l'absence de taille, ce qui est généralement le cas). Cela conduit à une production de tomates plus "concentrée" (Lachachi, 2010). Ces variétés à croissance déterminée sont donc privilégiées lorsque l'on recherche un rendement élevé en tonnage, mais

sur une période de production relativement courte, d'environ 6 à 7 semaines. Elles sont principalement utilisées en plein champ (Laumonnier, 1979). Parmi les principales variétés, on trouve : Celsior, Prisca, Balca, Fandango, Cencarra, Floradade, Aplá, Topla, Carma, Sixtima, Earlymat, Lérica, Roma, San Marzano (Adab, 2001) et Tomito F1, Sanzana F1, Roma F1, Hector F1 (Aujardin, 2021).

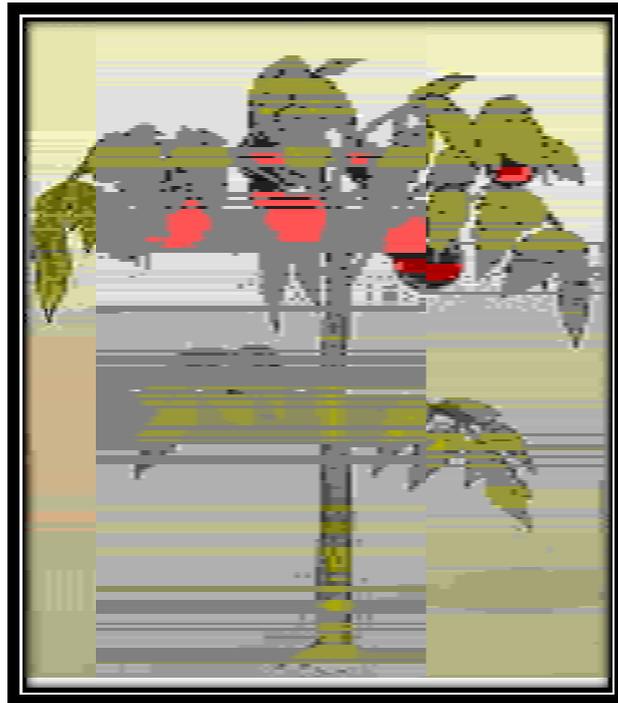


Figure 4 Plant de tomate à croissance déterminée (Akpo, 2022).

2.2.1.2.2- Variétés à croissance indéterminée

Dans ces variétés, la tige principale se développe de manière régulière, formant généralement un bouquet de fleurs toutes les trois feuilles. Le sommet de la tige s'allonge de façon constante, produisant continuellement de nouvelles pousses, feuilles et inflorescences (Figure 5). Cela entraîne une prolongation de la période de production des fruits. La croissance est interrompue par la mort de la plante ou par le pincement du bourgeon terminal à la hauteur désirée. Il peut y avoir jusqu'à 6 ou 7 générations de fleurs au cours d'une saison, voire plus, avec des tiges pouvant atteindre plusieurs mètres de longueur (7 mètres pour certaines variétés) (Laumonnier, 1979 ; Lachachi, 2010). Ce groupe se distingue par un rendement significatif étalé sur une longue période (Laumonnier, 1979), en voici quelques exemples : Daniela, Cristal, Trésor, Rambo, Caruso, Tradiro, Félicia, Belliro, Rondello,

Marylin, Excell, Palmiro, Ronduro, Pégase (Adab, 2001) ; Lemon boy F1, Yellow pear, Red pear, Sweet 100 F1, Marmande F1, Pyros F1, Montfavet F1, Rita F1, Premio F1, Cobra F1 (Aujardin, 2021).

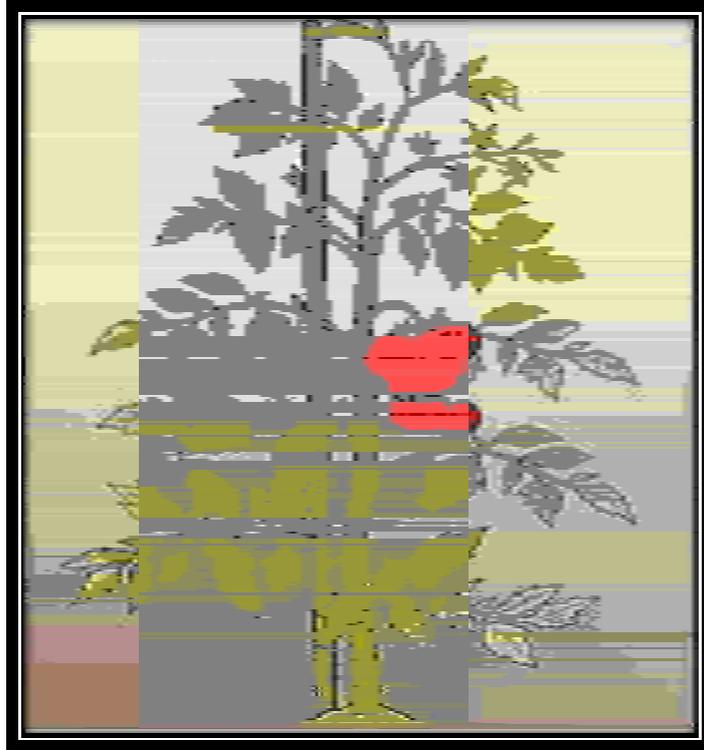


Figure 5 Plant de tomate à croissance indéterminée (Akpo, 2022).

2.2.1.2.3- Variété à croissance semi-déterminée

Cette catégorie représente une situation intermédiaire. Initialement, la croissance peut être déterminée mais se produit assez tardivement, ce qui entraîne un allongement des tiges. Par la suite, la croissance devient déterminée, mais une nouvelle pousse démarre tardivement, redonnant ainsi un nouvel élan à la croissance végétative (Lachachi, 2010). Des exemples comprennent le Costoluto genovese, la Grappe de Noël, le Révérend Michael Keyes, la Potato leaf variegated, la Dusya oranzehevaja (Cultivetaurue, 2019).

2.2.2- Importance de la culture de tomates dans le contexte du bio-contrôle

La culture de tomates occupe une place prépondérante dans l'agriculture mondiale en raison de sa grande valeur économique et de sa large consommation. Cependant, la production de tomates est souvent entravée par divers pathogènes tels que les champignons, les bactéries

et les virus, qui peuvent causer des maladies graves et réduire les rendements. Dans ce contexte, le biocontrôle émerge comme une alternative prometteuse aux pesticides chimiques pour la gestion des phytopathogènes des tomates. En utilisant des organismes vivants tels que des agents de lutte biologique, des microorganismes antagonistes, des extraits de plantes et des produits naturels, le biocontrôle vise à réduire l'impact des maladies tout en préservant la santé des plantes, la qualité des fruits et la durabilité des écosystèmes agricoles. La recherche dans le domaine du biocontrôle des phytopathogènes des tomates s'intensifie, offrant de nouvelles perspectives pour une agriculture plus respectueuse de l'environnement et durable.

La tomate figure parmi les légumes les plus cultivés, transformés et consommés à l'échelle mondiale, comme indiqué par plusieurs études (Costa et Heuvelink, 2005 ; Naika *et al.*, 2005 ; Royer, 2013). En effet, sa production occupe le deuxième rang mondial juste après la pomme de terre (Camara *et al.*, 2013), soulignant ainsi son importance tant sur le plan nutritionnel que sur le plan économique.

Au niveau mondial, l'agriculture maraîchère représente plus de 33 % de la production agricole totale et offre des emplois à environ 800 millions de personnes (Kanda *et al.*, 2014). Parmi les cultures maraîchères, la tomate se distingue comme l'une des principales productions, cultivée dans plus de 130 pays sur une superficie approchant les 2,5 millions d'hectares (Blancard, 2009). Cette culture est présente dans diverses zones climatiques, y compris dans des régions relativement froides, grâce au développement des techniques de culture sous abri (FAO, 2009). La tomate est ainsi devenue progressivement une culture industrielle à l'échelle mondiale. En 2020, la culture de la tomate a atteint des sommets historiques, avec une production record de 186 821 216 tonnes sur une superficie de 5 051 983 hectares (FAOSTAT, 2022), ce qui représente un rendement moyen d'environ 37 tonnes par hectare. La répartition des productions est la suivante : 62,6 % en Asie, 13,1 % en Amérique, 12,2 % en Europe, 11,9 % en Afrique et 0,2 % en Océanie. La Chine se positionne en tant que premier producteur mondial avec environ 64,77 millions de tonnes, suivie par l'Inde, la Turquie, les États-Unis et l'Égypte dans un ordre décroissant (FAOSTAT, 2022).

En Algérie, la culture de la tomate occupe la deuxième place après celle de la pomme de terre. Elle a débuté au cours des années 1900, notamment dans la région de l'est, avec l'établissement de la première conserverie TOMACOOOP à Annaba. En 1970, le nombre d'usines est passé à 26 à l'échelle nationale. Les superficies dédiées à la culture de la tomate industrielle ont également augmenté, passant de 100 hectares en 1930 à 2 000 hectares en 1960, pour atteindre une fourchette comprise entre 16 000 et 20 000 hectares ces dernières

années (Si Mohamed, 2017). En effet, en 2018, la surface consacrée à la culture de la tomate était estimée à plus de 22 mille hectares, avec un rendement d'environ 58,7 tonnes/hectare, soit une quantité dépassant 1,2 million de tonnes dans le pays (FAO, 2020). Tipaza et Alger représentent ensemble 12% de la superficie agricole nationale, tandis que Mostaganem occupe 11%, et Biskra ainsi que El-Oued produisent chacune 9%. Les autres wilayas constituent les 59% restants en 2016 (Ministère de l'agriculture et du développement rural (MADR), 2019). D'après les données de la FAOSTAT de 2022, l'Algérie occupe la deuxième place en méditerranée, en termes de production de tomate en tonnage, juste derrière l'Espagne. La production de tomate en 2022 évaluée à plus de 1 660 000 tonnes (FAO, 2022), s'explique principalement par la grande superficie cultivée.

2.2.3- Maladies de la tomate

La tomate est sujette à de nombreuses maladies provoquées par plusieurs agents, notamment des champignons, des bactéries, des virus et des phytoplasmes, ainsi que des troubles physiologiques. Ces affections se manifestent par divers symptômes tels que des taches sur les fruits, des pourritures, des flétrissures et des lésions sur les feuilles (Jones *et al.*, 2014 ; Elshafi *et al.*, 2017).

2.2.3.1- Fusariose de la tomate

Les maladies fongiques exercent un impact significatif sur la production de tomates, notamment celles causées par les espèces de *Fusarium*, qui sont particulièrement notables. La maladie se présente sous deux formes : l'une affecte les vaisseaux et l'autre les racines. Les champignons sont responsables de graves pertes de rendement à l'échelle mondiale. Ils peuvent infecter les plants de tomates par la germination des spores ou du mycélium, entraînant une augmentation de la transpiration de la plante et une réduction de la translocation des nutriments (Blancard, 2019 ; Blancard, 2021).

2.2.3.2 - Le genre *Fusarium*

Le *Fusarium*, initialement décrit par Linke en 1809, appartient à la famille des Tuberculariacées, au sein du groupe des Hyphomycètes (champignons filamenteux). En raison de l'absence de reproduction sexuée, ces champignons sont classés parmi les Deutéromycètes (champignons imparfaits), un regroupement artificiel de formes asexuées variées. Cependant, certaines espèces de *Fusarium* présentent une forme sexuée, également appelée forme parfaite ou téléomorphe, qui est classée dans les genres *Necteria* ou *Gibberella* (Gams et Nirenberg, 1989). Les espèces de *Fusarium* sont des agents pathogènes largement répandus dans le sol, présents de manière cosmopolite. Ils ont été isolés dans les régions

polaires ainsi que dans les déserts de sable (Djaffri et Khelifa 2020). On les retrouve également dans les terres cultivées et dans les régions chaudes tropicales. Ils sont associés à diverses maladies des plantes, notamment le flétrissement vasculaire, la pourriture et les maladies de la fonte des semis (Bodah, 2017).

Les spores de *Fusarium* se dispersent aisément dans l'eau et peuvent être transférées d'une plante à l'autre par projection (Buechel, 2021). Cela entraîne le flétrissement, la pourriture de la couronne et des racines, et finalement la mort de la plante (Akbar *et al.*, 2018 ; Manikandan *et al.*, 2018). *Fusarium oxysporum* est une espèce répandue et diversifiée sur le plan phylogénétique, connue pour sa capacité à produire des mycotoxines (Irzykowska *et al.*, 2012). Elle est considérée comme l'espèce la plus courante causant des flétrissures, ainsi que la pourriture de la couronne et des racines, dans différentes cultures. Cependant, d'autres espèces de *Fusarium* évoluent constamment et sont de plus en plus associées à de nombreuses maladies de flétrissement touchant différents légumes, notamment la tomate, la pomme de terre, l'oignon, le poivron, le piment, le chou-fleur, le poivre doux et bien d'autres (Jamiołkowska, 2008 ; Ramidial *et al.*, 2016 ; Akbar *et al.*, 2018).

2.2.3.3- *Fusarium napiforme*

Fusarium napiforme est phylogénétiquement lié à *F. verticillioides* et à d'autres espèces au sein du clade africain du complexe d'espèces *G. fujikuroi* (O'Donnell *et al.*, 1998). Cette espèce a d'abord été identifiée dans les grains de mil et de sorgho en Afrique du Sud et en Namibie (Marasas *et al.*, 1987). Cette espèce est morphologiquement distinguée par sa production de microconidies napiformes et en forme de citron. Les chlamydospores de *F. napiforme* sont des structures à paroi épaisse et uninucléées, avec un cytoplasme riche en corps lipidiques et sont similaires à d'autres chlamydospores chez *Fusarium* (Marasas *et al.*, 1987). Les chaînes de microconidies sont absentes chez *F. dlamini*, tandis que *F. nygamai* et *F. napiforme* produisent de courtes chaînes de microconidies (généralement < 10 microconidies) sur milieu PDA (Potatoes Dextrose Agar). Sur milieu KCl, les chaînes produites par *F. napiforme* sont beaucoup plus longues (généralement > 25 microconidies), et ces cultures peuvent être facilement confondues avec *F. moniliforme*. L'absence de polyphialides et la présence de microconidies napiformes en forme de citron distinguent *F. napiforme* de *F. nygamai*. Les microconidies napiformes caractéristiques et les chlamydospores de *F. napiforme* ne sont cependant pas, facilement observables dans les cultures jeunes et se forment dans des cultures d'au moins 21 jours. Ainsi, un examen attentif des cultures plus

âgées que celles généralement utilisées dans l'identification des espèces de *Fusarium* est nécessaire pour distinguer *F. napiforme* de *F. moniliforme* (Marasas *et al.*, 1987).

2.2.3.4- Alternariose de la tomate

Cette infection cryptogamique peut être observée aussi bien en plein champ qu'en serre, et elle affecte toutes les parties de la plante. Les infections sont particulièrement sévères lors des périodes humides et dans les climats chauds. Sa propagation se fait par le biais des graines, du vent, de la pluie, ainsi que des débris de culture infectés. Les plantes ayant subi des dommages sont plus susceptibles d'être touchées par cette maladie (Hilmi *et al.*, 2020). Le champignon responsable de cette maladie est *Alternaria tomatophila*. Il affecte tous les organes aériens de la tomate à chaque étape de sa croissance. Il se manifeste principalement par des taches foliaires vert foncé qui évoluent rapidement vers le brun foncé à noir. Des lésions similaires sont également observées sur les tiges. Les fruits exhibent des taches concaves et peuvent être enveloppés par une moisissure noire et veloutée. Les lésions sur les fruits peuvent entraîner leur chute (Blancard, 2013). Diverses espèces du genre *Alternaria* peuvent également provoquer des altérations, telles que : *Alternaria alternata*, *Alternaria tenuissima* et *Alternaria solani*, qui produisent l'alternariol, une mycotoxine ayant des effets cancérigènes. Elle est associée au cancer de l'œsophage ainsi qu'à des maladies hématologiques (Tiessen *et al.*, 2017).

2.2.3.5- Le genre *Alternaria*

Le genre *Alternaria* appartient à la famille des *Pleosporaceae*, à l'ordre des Pleosporales, de la classe des Dothideomycètes (Hongsanan *et al.*, 2020). Ce genre compte plus de 700 espèces répertoriées, mais seulement environ 378 espèces sont reconnues dans 28 sections, dont moins de 100 ont des données moléculaires pour préciser leurs affiliations phylogénétiques (Hongsanan *et al.*, 2020, Ahmadpour *et al.*, 2021). *Alternaria* est largement reconnu comme un pathogène végétal sérieux ainsi que comme un agent pathogène post-récolte, entraînant d'importantes pertes de cultures, ou pouvant également être à l'origine de maladies chez les animaux et les humains ou agir en tant qu'allergènes aériens (Wodenberg *et al.*, 2014).

Alternaria est largement connu comme étant un type d'hyphomycètes dématiacés présents partout. Ses conidiophores, soit ramifiés, soit branchés, sont associés à des cellules conidiogènes discrètes, pouvant être solitaires ou en chaîne, droites ou courbées, avec des septums phragmo- ou dictyoséptés, et des conidies brun moyen à brun foncé, terminées par une pointe arrondie ou étroitement pointue. Ce champignon occupe une variété de niches

écologiques grâce à ses différents modes de vie, allant des endophytes aux pathogènes en passant par les saprophytes, et se retrouve sur une large gamme de substrats hôtes, incluant les produits agricoles, les animaux, les plantes, les graines, le sol et même l'atmosphère (Lawrence *et al.*, 2016 ; Li *et al.*, 2022).

2.2.3.6- *Alternaria alternata*

Alternaria alternata, également connue sous le nom d'*Alternaria Nees ex Fr.*, représente l'espèce la plus répandue au sein du genre *Alternaria* (Wiktor, 2008). *A. alternata* est un Deutéromycète caractérisé par un mode de reproduction exclusivement asexué (Gauthier, 2016). C'est un champignon saprophyte, largement répandu à travers le monde, se trouvant dans le sol ou sur des tissus végétaux, qu'ils soient en bon état ou en décomposition. Plus précisément, cette espèce agit en tant que pathogène des végétaux, se manifestant comme un opportuniste en provoquant la maladie des taches brunes sur les feuilles, les tiges et les fruits lorsque les conditions sont favorables. Les dommages économiques résultant de cette moisissure sont significatifs, car elle affecte une large gamme de cultures hôtes agronomiques, notamment les céréales, les plantes ornementales, les cultures oléagineuses, les légumes et les fruits (Jarolim *et al.*, 2017). Le mycélium de *A. alternata* a une texture veloutée et une teinte variant du brun gris au noir (Gauthier, 2016). Les conditions optimales pour la croissance de *A. alternata* est de sept jours d'incubation à $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$ ensemencé sur milieu PDA (Xavier *et al.*, 2018). Les dictyospores de *A. alternata* peuvent être disposées de manière transversale ou longitudinale, comme indiqué par Watanabe (2002), et sont produites en chaînes de 10 ou plus, émanant des cellules conidiales de base ou apicales, selon les observations de Benada (2010). Les conidiophores présentent également une diversité de caractéristiques, avec des variations en termes de longueur, de ramification, et de couleur allant d'un brun pâle à un brun clair, chacun terminé par un court bec conique à l'extrémité (Abeer *et al.*, 2014).

2.3- Rôle des microorganismes dans le domaine du bio-contrôle

L'utilisation de composés produits par des plantes, des macro ou microorganismes pour lutter contre les pathogènes des plantes est une composante essentielle du bio-contrôle. Ces dernières années, on observe une croissance exponentielle dans le développement de nouveaux produits de bio-contrôle à base de microorganismes, dépassant largement celle des autres agents de lutte biologique (Robin *et al.*, 2019). Les bactéries, les moisissures, les levures, les virus et les phages sont parmi les principaux types de microorganismes utilisés dans ce contexte, souvent présents dans le sol et démontrant des activités antagonistes. Certaines levures produisent des composés organiques volatils, tel que *Galactomyces*

candidum, dont la libération de molécules diffusibles entraîne l'inhibition de *Botrytis cinerea in vitro* (Chen *et al.*, 2018). Les mycovirus, qui infectent les champignons, ont démontré leur efficacité pour ralentir voire inhiber, la croissance des champignons infectés, réduisant ainsi leur pathogénicité (Kumar *et al.*, 2016). En 2019, trois nouveaux bactériophages de la famille des *Podoviridae*, efficaces contre *Ralstonia solanacearum*, ont été découverts. Ils présentent une spécificité vis-à-vis de leur pathogène qui est remarquablement élevée (Alvarez *et al.*, 2018).

Les moisissures peuvent jouer un rôle crucial dans le biocontrôle, notamment dans la lutte contre les pathogènes des plantes (Ghorbanpour *et al.*, 2017). En effet, les moisissures peuvent concurrencer d'autres microorganismes pour les ressources nutritives, ce qui réduit la disponibilité des nutriments nécessaires à la croissance des pathogènes, c'est ce qu'on appelle l'antagonisme compétitif (Sharma, 2021). De plus, certaines moisissures sont capables de synthétiser des métabolites qui ont des effets antimicrobiens, ce qui peut aider à contrôler les populations de pathogènes et déclencher des réponses de défense chez les plantes hôtes, renforçant ainsi leur capacité de résistance (Gupta *et al.*, 2021).

Les bactéries constituent le groupe dominant de microorganismes dans le bio-contrôle (Berendsen *et al.*, 2012). La plupart ne sont pas nuisibles aux plantes car elles ont souvent du mal à survivre longtemps dans le sol (sauf les bactéries sporulantes). De plus, leur capacité à infecter les plantes nécessite souvent une plaie pour pénétrer (Raiimakers *et al.*, 2009 ; Fifiani, 2021). En revanche, les bactéries bénéfiques aux plantes sont assez courantes et jouent un rôle crucial dans le maintien de leur santé. Elles interagissent avec les racines des plantes, peuvent les coloniser, favoriser leur croissance et les protéger contre les pathogènes grâce à divers mécanismes. Elles sont appelées PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria), ce qui signifie les rhizobactéries favorisant la croissance des plantes. Parmi ces bactéries, les plus connues et exploitées, sont celles des genres *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Azotobacter* et *Serratia* (Glick *et al.*, 2012). Dans cette étude, nous nous sommes intéressés à la moisissure du genre *Chaetomium* ainsi qu'aux bactéries du genre *Bacillus*.

2.3.1- Le genre *Chaetomium*

Le genre *Chaetomium* comprend entre 80 et 100 espèces, avec des variations significatives dans les données taxonomiques pour ce genre. *Chaetomium globosum* est l'espèce la plus reconnue et étudiée (Pieckova, 2003). Parmi les espèces les plus courantes, on trouve *Chaetomium atrobrunneum*, *C. funicola*, *C. globosum* et *C. strumarium*.

Le genre *Chaetomium* est courant et répandu à travers le monde, se trouvant généralement dans le sol et sur la matière végétale en décomposition (Abbott *et al.*, 1995). Cependant, les niveaux des spores de ces champignons dans l'air extérieur, sont relativement faibles (Khan *et al.*, 2003). À l'intérieur, ils prospèrent sur la cellulose et peuvent être présents sur divers matériaux tels que le bois, les panneaux de gypse, le compost, la paille, etc. Ils sont également connus pour causer la pourriture du bois, affectant aussi bien les résineux que les bois durs.

Diverses souches de *Chaetomium spp.* ont démontré des activités antifongiques variables, à la fois *in vitro* et *in vivo*, contre de nombreux agents phytopathogènes tels que *Fusarium*, *A. raphani*, *A. brassicicola*, *Phytophthora* et *Pythium ultimum* (Vitale *et al.* 2012). Tomilova et Shternshis (2006) ont également signalé que *Chaetomium spp.* a été efficacement utilisé pour contrôler des maladies telles que le semis tombant de la betterave sucrière et la pourriture des racines chez les agrumes et le poivre noir. Toutefois, avant d'utiliser *Chaetomium spp.* dans des applications sur le terrain, divers paramètres environnementaux tels que la température, l'humidité du sol et le pH doivent être pris en compte, car ils peuvent influencer leur efficacité et leur potentiel antagoniste.

2.3.2- Le genre *Bacillus*

Le genre *Bacillus* englobe les bactéries qui font partie de la famille *Bacillaceae* et de l'ordre *Bacillales*, appartenant à la branche des *Firmicutes*. Ce sont des bactéries à Gram positif, capables de vivre dans des environnements aérobies ou anaérobies facultatives. Elles se distinguent par leur capacité à former des endospores en conditions aérobies lorsque les conditions de croissance deviennent défavorables. Ces bactéries peuvent coloniser divers habitats écologiques (Radhakrishnan *et al.*, 2017). Une grande diversité existe au sein de ce genre, qui est caractérisée par des différences dans la morphologie des spores, dans leur taille, et dans les conditions optimales de croissance en termes de pH et de température, ainsi que dans leur activité biochimique (Zeigler et Perkins, 2015).

2.3.2.1-*Bacillus halotolerans*

L'ancien nom de *Bacillus halotolerans* est *Brevibacterium halotolerans*. Delaporte et Sasson (1967) ont identifié cette espèce dans un échantillon de sol collecté au Maroc. Ce nom est apparu dans la liste officielle des noms de bactéries en 1980. Il convient de noter que *Bacillus halotolerans* n'a été classé dans le genre *Bacillus* qu'en 2017, lorsque Ben Gad et Gerchma (2017), ont revu la classification de cette espèce qui était auparavant rangée parmi les *Brevibacterium*. Cette révision taxonomique s'est appuyée sur des caractérisations

microscopiques et biochimiques, révélant que *B. halotolerans* était plus apparenté au genre *Bacillus* qu'à *Brevibacterium*. *B. halotolerans* est inclus dans le groupe de *Bacillus subtilis*, et plus spécifiquement dans le sous-groupe de *Bacillus mojavensis*. Il partage des caractéristiques phénotypiques similaires avec *Bacillus subtilis subsp. subtilis* et *Bacillus mojavensis*, rendant leur distinction pratiquement impossible par les méthodes d'identification phénotypique. *B. halotolerans* est une bactérie aérobie à Gram positif, de forme bacillaire, mobile, produisant des spores ellipsoïdales centrales ou para-centrales. Les cellules ont une taille comprise entre 2 et 4 µm et sont généralement observées individuellement ou en chaînes. Les colonies sont macroscopiquement opaques, lisses, circulaires et intactes, avec un diamètre variant entre 1 et 2 mm. Sa température de croissance optimale se situe entre 28 et 30°C. La majorité des espèces de *B. halotolerans* peuvent survivre dans des milieux extrêmes, tels que des conditions de forte salinité et un pH alcalin (Wu *et al.*, 2021). Tout comme les espèces qui composent le groupe *Bacillus subtilis*, *B. halotolerans* sont des bactéries ubiquitaires souvent trouvées dans le sol, l'eau et l'air. Ces organismes sont considérés comme inoffensifs car ils ne sont associés à aucune maladie. Ils ne sont donc ni pathogènes ni toxiques pour l'Homme, les animaux ou même les plantes (Piggot, 2009).

En moyenne, le génome complet de *B. halotolerans* mesure 4,5 Mb. En général, il est constitué de plusieurs gènes impliqués dans la résistance au stress saliné et la biosynthèse de composés antifongiques. Les gènes associés à la biosynthèse des dipeptides non ribosomiques, capables d'induire la lyse des cellules fongiques, comprenant par exemple le gène bac A qui code pour le Bacilysin, sont abondamment présents dans le génome de *B. halotolerans* (Sagredo-Beltran *et al.*, 2018). On retrouve également des gènes codant pour des métabolites secondaires antimicrobiens tels que les surfactines, les fengycines et les bacillibactines. De plus, des gènes impliqués dans la biosynthèse de régulateurs de croissance des plantes tels que les auxines et les spermidines ont également été identifiés (Thomloui *et al.*, 2021).

Slama Ben *et al.* (2019) ont signalé que *B. halotolerans* pouvait inhiber efficacement des espèces du genre *Fusarium* sur les fruits de la tomate et présentait une forte inhibition *in vitro* à d'autres phytopathogènes majeurs, notamment *A. alternata*, *B. cinerea*, *Rhizoctonia bataticola* et *Phytophthora infestans*.

2.3.2.2- Mode d'action des microorganismes contre les pathogènes

L'action des microorganismes contre les pathogènes végétaux, est un domaine de recherche en plein essor dans le cadre de la protection des cultures. Les microorganismes, tels que les

bactéries, les champignons et les virus, sont largement étudiés pour leur capacité à agir comme agents de biocontrôle, c'est-à-dire pour leur aptitude à réduire l'incidence et la gravité des maladies des plantes causées par des agents pathogènes (Fravel 2005, Wafaa 2007). Les *Bacillus*, en particulier les espèces *Bacillus subtilis* et *Bacillus thuringiensis*, sont largement étudiés pour leur potentiel de biocontrôle contre les pathogènes végétaux (Horak *et al.*, 2019). Leur mode d'action comprend plusieurs mécanismes clés :

- **Compétition pour les nutriments** : Les *Bacillus* colonisent la rhizosphère et le phylloplane des plantes, et rentrent ainsi en compétition avec les pathogènes pour les nutriments et l'espace disponibles. Cette compétition peut réduire la croissance et la virulence des pathogènes, contribuant ainsi à la protection des plantes contre les infections (Alabouvette *et al.*, 2006).
- **Activation du système immunitaire des plantes** : certains *Bacillus* induisent des réponses de défense systémiques chez les plantes hôtes, renforçant ainsi leur capacité à se défendre contre les pathogènes. Cette induction peut se faire par la production de composés de signalisation, tels que l'acide salicylique et les jasmonates, ou par la stimulation des voies de signalisation spécifiques des plantes (Benitez *et al.*, 2004).
- **Production d'enzymes de dégradation des parois cellulaires** : Certains *Bacillus* produisent des enzymes, telles que les chitinases, les protéases et les glucanases, qui dégradent les composants des parois cellulaires des pathogènes fongiques, facilitant ainsi leur élimination par la plante hôte (Yasmin *et al.*, 2016 ; Rais *et al.*, 2017).
- **Production d'antibiotiques et de composés antifongiques** : Les *Bacillus* sécrètent divers métabolites secondaires, tels que les antibiotiques de la classe des lipopeptides, des polypeptides et des macrolides, qui ont une activité antifongique contre une large gamme de pathogènes végétaux. Ces substances inhibent la croissance et la propagation des pathogènes en perturbant leur physiologie (Jijakly, 2003).

En résumé, les *Bacillus* exercent leur action de biocontrôle contre les pathogènes végétaux en combinant divers mécanismes, notamment la production de substances antifongiques, la compétition écologique, la stimulation du système immunitaire des plantes et la production d'enzymes de dégradation. Cette combinaison de stratégies contribue à réduire la virulence des pathogènes et à renforcer la résistance des plantes aux infections, offrant ainsi une alternative durable aux pesticides chimiques.

2.4- Fermentation

La fermentation est un processus biologique essentiel avec de nombreuses applications pratiques dans divers domaines. Elle repose sur l'activité métabolique des microorganismes

pour transformer les substrats organiques en produits utiles, offrant ainsi une alternative durable aux processus chimiques traditionnels. Elle est largement utilisée dans de nombreux secteurs industriels pour la production de divers produits. Par exemple, elle est utilisée dans l'industrie alimentaire pour la production de pain, de fromage, de vin, de bière, de yaourt, etc. Elle est également utilisée dans l'industrie pharmaceutique pour la production d'antibiotiques, de vitamines, d'enzymes, etc., ainsi que dans l'industrie chimique pour la production de biocarburants, d'acides organiques, de solvants, etc. (Ashby *et al.*, 2019).

2.4.1- Conditions de fermentation

La fermentation des microorganismes dépend de plusieurs conditions essentielles pour assurer un processus efficace. Ces conditions comprennent notamment le substrat utilisé, le pH du milieu, la température, la disponibilité d'oxygène, et la présence éventuelle, de nutriments supplémentaires ou de co-facteurs (Stanley *et al.*, 2010 ; Abdel-rahman *et al.*, 2013). En ajustant ces paramètres, il est possible de favoriser la croissance et l'activité métabolique des microorganismes désirés, ce qui peut conduire à la production de divers produits, tels que des acides organiques, des alcools, des enzymes, ou des biocarburants (Liu *et al.*, 2018). Une compréhension précise et un contrôle approprié de ces conditions sont donc cruciaux pour optimiser les processus de fermentation et maximiser les rendements de production (Zhang *et al.*, 2018).

2.4.2- Types de fermentation

2.4.2.1- Fermentation solide

La fermentation en milieu solide se caractérise par la présence de matière solide, principalement ligno-cellulosique dans le cas des végétaux, et une faible quantité d'eau (Laufenberg *et al.*, 2003 ; Abu Yazid *et al.*, 2017). Elle donne lieu à diverses fermentations spontanées comme l'ensilage ou le compostage, et elle est couramment utilisée dans la production d'aliments fermentés tels que les olives, la choucroute ou le tofu à base de soja. Ce processus est également employé pour produire des biosurfactants, de l'éthanol, de la biomasse, des enzymes, des acides organiques, des acides aminés, des molécules antimicrobiennes et des molécules aromatiques (Couto et Sanromán, 2006 ; Abu Yazid *et al.*, 2017).

2.4.2.2- Fermentation liquide

La fermentation liquide est un processus biologique dans lequel des micro-organismes se développent dans un milieu liquide (Salihu *et al.*, 2012). Ce type de fermentation est

couramment utilisé dans la production de boissons fermentées. Par exemple, dans la fermentation de la bière, les levures sont ajoutées au moût de malt sucré, où elles métabolisent les sucres pour produire de l'alcool et du dioxyde de carbone, ainsi que des composés aromatiques qui contribuent à la saveur finale de cette boisson (Paddon *et al.*, 2013). De même, dans la production de vin, les levures présentes naturellement sur la peau des raisins ou ajoutées délibérément au moût, fermentent les sucres du jus de raisin pour produire de l'alcool et d'autres composés volatils qui définissent les caractéristiques organoleptiques du vin. La fermentation liquide offre également un contrôle précis sur les conditions de fermentation, telles que la température, le pH et la composition du milieu, ce qui permet d'obtenir des produits finis avec une grande diversité de profils sensoriels et de qualités gustatives (Pandey *et al.*, 2018).

Dans les deux types de fermentation, les micro-organismes métabolisent les substrats disponibles pour obtenir les produits finaux tels que les acides organiques, l'alcool, le gaz carbonique, les arômes, et parfois les composés toxiques ou indésirables. La fermentation est largement utilisée dans l'industrie alimentaire pour l'obtention de divers produits fermentés, ainsi que dans d'autres applications telles que la production d'énergie et la dépollution (Pandey *et al.*, 2018).

2.5- Substrat de fermentation : Paille d'avoine

Dans le domaine de la fermentation, divers substrats sont utilisés pour favoriser la croissance des microorganismes et la production de produits fermentés. Parmi ces substrats, on retrouve la paille d'avoine, le blé et la paille d'orge, qui sont des matières végétales riches en composés carbonés pouvant être dégradés par les microorganismes fermentaires. La paille d'avoine, en particulier, présente un intérêt croissant dans la recherche en raison de ses propriétés particulières. En tant que sous-produit agricole abondant, la paille d'avoine offre une source renouvelable et économiquement viable pour la production de bioénergie, et d'autres composés à haute valeur ajoutée par fermentation. Sa composition chimique, comprenant des polysaccharides tels que la cellulose et l'hémicellulose, ainsi que des composés phénoliques, en font un substrat attrayant pour une gamme diversifiée de microorganismes fermentaires. De plus, l'utilisation de la paille d'avoine comme substrat de fermentation contribue à la valorisation des déchets agricoles, à la réduction des émissions de gaz à effet de serre et à la promotion d'une économie circulaire et durable (Kim *et al.*, 2019). De ce fait, la paille d'avoine émerge comme un substrat prometteur dans la recherche en

fermentation, offrant des opportunités pour développer des processus de production plus efficaces, durables et respectueux de l'environnement.

2.5.1- Description de la plante

L'avoine est une plante annuelle dont les racines sont abondamment fasciculées dans les dix premiers centimètres du sol. Elle peut également développer des racines adventives au niveau des nœuds, avec des tiges atteignant une hauteur de 80 à 150 cm. Ces tiges peuvent être simples ou ramifiées à la base et produisent un tallage important. Il s'agit d'une plante monocotylédone avec une tige cylindrique mesurant de 25 à 150 cm de haut. Les feuilles peuvent être plates ou enroulées, avec une ligule courte et tronquée. Les épillets ne sont pas regroupés de manière dense, ils sont portés sur des pédicelles, pendants, et disposés en panicules ou en grappes étalées. Chaque épillet renferme deux fleurs fertiles. Les glumes sont de tailles égales ou presque, et dépassent les fleurs. Les glumelles sont également presque de tailles égales, avec une caractéristique particulière : la glumelle inférieure présente une arête flexueuse ou tordue. Chaque fleur possède trois étamines, et les stigmates sont directement attachés au carpelle. Le grain (caryopse) est oblong, avec des poils à son sommet, et est enveloppé à la base par les glumelles (Clerget, 2011).

Bien que l'avoine soit une céréale robuste cultivée principalement dans les régions tempérées, elle est de moins en moins présente sur les terres agricoles. Utilisée principalement comme fourrage vert (feuillage et paille) et dans l'alimentation humaine et animale, elle est également cultivée pour ses grains. L'avoine trouve ses origines dans le nord-est de l'Europe (notamment en Autriche et en Russie) ainsi que sur les hauts plateaux de l'Éthiopie et de la Chine. La plus ancienne trace d'avoine cultivée a été retrouvée dans des grottes en Suisse, datant de l'âge de bronze. L'introduction de l'avoine en Amérique remonte à 1609, sur les îles Élisabeth au large des côtes du Massachusetts. George Washington, le premier président des États-Unis, aurait semé 234,71 hectares d'avoine en 1786 (Sirodot, 2016).

Avena sativa L. est la seule espèce cultivée d'un genre comprenant environ 33 espèces réparties autour du bassin Méditerranéen. Tout comme le genre *Triticum*, le genre *Avena* comprend des espèces diploïdes ($2n=14$), tétraploïdes ($2n=28$) et hexaploïdes ($2n=42$). Les mécanismes évolutifs et les processus de polyploïdie sont essentiellement similaires à ceux observés chez le blé. Contrairement à ce dernier, le processus de domestication et de culture de l'avoine concerne principalement les espèces hexaploïdes. Deux autres espèces, l'avoine rouge et l'avoine blanche, sont mentionnées dans la littérature comme ayant été cultivées dans

les premiers temps en Méditerranée orientale. Ces espèces ont des panicules peu denses et leurs grains ont tendance à se détacher à maturité. Elles sont maintenant considérées comme faisant partie de l'*Avena sativa* étant donné qu'elles partagent le même génome. Leur similitude génétique avec l'*Avena sativa* ne justifie pas de leur accorder un statut spécifique (Sirodot.G-E., 2016).

D'après Feillet (2000), l'avoine est une plante monocotylédone herbacée annuelle. (Salgado et al., 2008) ont classifié l'avoine comme suit :

Règne	Plantae
Division	Magnoliophyta
Classe	Liliopsida
Ordre	Cyperales
Famille	Poaceae
Sous-famille	Pooideae
Tribu	Aveneae
Genre	<i>Avena</i>
Espèce	<i>Avena sativa</i> L.

2.5.2- Disponibilité en Algérie

La disponibilité de la paille d'avoine en Algérie peut varier en fonction de plusieurs facteurs, notamment les conditions climatiques, les pratiques agricoles et la demande locale. L'avoine est cultivée dans plusieurs régions d'Algérie, principalement dans les zones à climat tempéré où les conditions de croissance sont favorables. La quantité de paille d'avoine dépendra donc de la superficie cultivée et du rendement de la récolte dans ces régions. Les agriculteurs algériens utilisent souvent la paille d'avoine comme matériau de paillage, pour l'alimentation (Benyacoub et al., 2016). Cependant, il est important de noter que cette disponibilité de la paille d'avoine peut être influencée par d'autres facteurs tels que la concurrence avec d'autres cultures, les pratiques de gestion des résidus de récolte et les fluctuations des prix des céréales sur le marché (Abadia et al., 2018). Dans les régions où l'avoine n'est pas largement cultivée ou dans les régions où les rendements sont faibles, la disponibilité de la paille d'avoine peut être limitée (Karouf et al., 2018).

2.5.3- La paille d'avoine comme substrat de fermentation

La paille d'avoine, un sous-produit agricole, offre un substrat potentiellement intéressant pour la fermentation. Avant d'être utilisée comme substrat, la paille d'avoine peut nécessiter un traitement préalable pour améliorer sa digestibilité par les micro-organismes (Arévalo-Gallegos et al., 2017). Des méthodes telles que le broyage ou le trempage peuvent être

employées pour fragmenter la paille et augmenter sa surface spécifique, ce qui facilite l'action des enzymes et des micro-organismes. Une fois prétraitée, la paille d'avoine peut être utilisée dans divers processus de fermentation, tels que la production d'aliments fermentés ou la bioconversion en produits chimiques ou biocarburants. L'utilisation de la paille d'avoine comme substrat de fermentation présente l'avantage supplémentaire de valoriser un déchet agricole, tout en contribuant à la production de produits à valeur ajoutée (Arévalo-Gallegos *et al.*, 2017 ; Abadia *et al.*, 2018 ; Karouf *et al.*, 2018, Kim *et al.*, 2019).

2.6- Modélisation

La modélisation revêt une importance primordiale dans de multiples domaines scientifiques et techniques, offrant la possibilité de représenter et de simuler des phénomènes complexes. Qu'il s'agisse de la physique, de la biologie, de l'économie ou d'autres disciplines, les modèles jouent un rôle important dans la compréhension, la prédiction et la prise de décision (Lee *et al.*, 2010). L'avènement de l'informatique et des technologies numériques a largement élargi le champ d'application de la modélisation, facilitant la création de modèles de plus en plus élaborés et précis. Ces modèles sont utiles pour simuler des systèmes dynamiques, analyser des données, optimiser des processus, voire évaluer des politiques publiques (Fishwick, 2007). Cependant, la modélisation comporte également des défis, notamment en ce qui concerne le choix des hypothèses, la validation des résultats et l'évaluation des incertitudes. Il est donc essentiel d'adopter une approche rigoureuse et transparente dans la construction et l'utilisation des modèles (Saltelli *et al.*, 2008).

2.6.1- Plan de Box-Benken

Le plan de Box-Behnken (BBD : Box-Behnken Design) est un plan expérimental et un modèle non linéaire de la méthodologie des surfaces de réponse développé par Box et Behnken en 1960. Le plan de Box-Behnken crée une matrice nécessaire à la combinaison des paramètres du processus étudié. Ce plan permet de développer un modèle de surfaces de réponse quadratique qui est utilisé pour l'estimation ou la prédiction des valeurs attendues (Takindal *et al.*, 2012 ; Agarwal *et al.*, 2014 ; Yu *et al.*, 2016). La technique d'optimisation consiste à la recherche de la valeur maximale ou minimale d'une fonction d'un ensemble de variables sous réserve de certaines conditions (Jayaram *et al.*, 2015). L'optimisation des paramètres du processus est réalisée à l'aide des techniques suivantes : éléments finis, conception de Taguchi, surfaces de réponse, algorithme génétique, réseaux de neurones artificiels (Aliemek *et al.*, 2020).

2.6.2- Méthode des surfaces de réponse (RSM : Response Surface Methodology)

La méthode des surfaces de réponse, conceptualisée par Box et ses collaborateurs dans les années 50 (Gilmour, 2006 ; Bruns *et al.*, 2006), trouve son origine dans l'analyse graphique qui émerge après le calibrage du modèle mathématique. Cette approche est devenue courante dans la littérature sur la chimiométrie. Elle englobe un ensemble de techniques mathématiques et statistiques visant à ajuster des modèles empiriques aux données expérimentales, en lien avec la conception des expériences. Pour ce faire, on utilise souvent des fonctions polynomiales linéaires ou quadratiques pour décrire le système étudié, permettant ainsi d'explorer et d'optimiser les conditions expérimentales par le biais de la modélisation et de l'ajustement (Teofilo *et al.*, 2006). La méthode des surfaces de réponse (RSM) intègre la modélisation mathématique et statistique pour aborder des données complexes lors de la conception expérimentale (Qin *et al.*, 2012 ; Saini *et al.*, 2020). Son principal atout réside dans la nécessité de quelques tests seulement pour élaborer un modèle, ce qui permet une exécution rapide et une précision élevée des réponses basées sur l'équation de régression (Kavitha *et al.*, 2016). En outre, les RSM permettent d'évaluer simultanément plusieurs interactions entre les paramètres sélectionnés et de suggérer les meilleures valeurs pour chacun d'eux (Roy *et al.*, 2018).

Les étapes clés dans l'application des RSM comme technique d'optimisation, sont (Bezerra *et al.*, 2008) :

- l'identification des variables indépendantes qui influencent significativement le système à travers des études de criblage et définition de la région expérimentale en fonction des objectifs de l'étude et de l'expertise du chercheur,
- choix de la conception expérimentale et réalisation des expériences selon la matrice expérimentale sélectionnée,
- traitement mathématique et statistique des données expérimentales en ajustant une fonction polynomiale,
- évaluation de la pertinence du modèle,
- vérification de la nécessité et de la faisabilité d'un ajustement vers la région optimale,
- détermination des valeurs optimales pour chaque variable étudiée.

2.6.3- Réseaux de neurones artificiels (ANNs : Artificial Neural Networks)

Les ANNs sont des systèmes adaptatifs artificiels inspirés par les processus de fonctionnement du cerveau humain (McCulloch 1943). Ils sont une forme d'intelligence artificielle qui vise à reproduire le réseau de neurones du cerveau humain, afin que les processeurs puissent reconnaître les signaux, les analyser et prendre des décisions comme le ferait un être humain. Les neurones artificiels sont programmés à l'aide d'ordinateurs pour agir comme des cellules cérébrales interconnectées afin de générer un ANN (Amato *et al.*, 2013). Les réseaux de neurones artificiels (ANNs) sont des outils puissants pour la prévision et l'amélioration des paramètres de processus *in silico* complexes, mettant en valeur leurs capacités d'approximation universelle, comme le montre Desai *et al.* en 2008. Néanmoins, il est crucial de reconnaître que même si les ANNs peuvent offrir des aperçus précieux, ils ne garantissent pas la faisabilité de la solution globale ultime, comme l'ont souligné Rajendra *et al.* en 2009. La création d'un modèle de réseaux de neurones artificiels (ANNs) implique l'intégration de plusieurs systèmes de traitement de données, chacun composé de multiples unités (neurones) (Vasseghian *et al.*, 2020 ; Dragoi et Vasseghian, 2021). Chaque neurone bénéficie de communications internes qui lui permettent de collaborer de manière harmonieuse avec les autres neurones. Par la suite, le modèle peut être entraîné en construisant un réseau de neurones artificiels interconnectés, en élaborant un algorithme d'apprentissage pour ce réseau, puis en l'appliquant à ce dernier. Le perceptron multi-couches (MLP : MultiLayer Perceptron), qui comprend une couche d'entrée, une ou plusieurs couches cachées et une couche de sortie, représente l'architecture d'un ANN à propagation avant la plus couramment utilisée (Ali et Abd, 2021). Les réseaux de neurones artificiels (ANNs) sont fréquemment entraînés en utilisant la méthode de rétropropagation (BP : Back Propagation) (Al-Kharashi et Skitmore, 2009) avec les techniques de régularisation Levenberg-Marquardt (LM) et Bayésienne (BR). De ce fait, le premier algorithme est une approche rapide de BP (Chou *et al.*, 2013) qui divise les données de manière aléatoire et le second algorithme est constitué de deux phases distinctes : apprentissage et test (Khalid *et al.*, 2017).

La sélection du modèle ANN et sa complexité déterminent le nombre de neurones cachés, une étape primordiale dans la construction du réseau. Un nombre trop faible de neurones cachés peut diminuer les performances de prédiction, tandis qu'un excès de neurones peut entraîner un surajustement et des délais de calcul considérables (Pandey *et al.*, 2016). Par conséquent, il est essentiel de choisir le nombre optimal de neurones pour obtenir la meilleure précision prédictive. Le coefficient de corrélation R , le coefficient de détermination R^2 et l'erreur quadratique moyenne (MSE : Mean Squared Error) sont des indicateurs utilisés pour

évaluer la précision du modèle. Une analyse de la performance de prédiction du modèle peut être réalisée lorsque la MSE est minimisée et que R^2 est élevé, typiquement supérieur à 0,98~0,99. Les fonctions de transfert les plus couramment utilisées sont la tangente sigmoïde (tansig) et la sigmoïde logarithmique (logsig), choisies pour optimiser la précision et l'exactitude des prédictions, en particulier lorsque le phénomène étudié est non linéaire (Ali et Abd, 2021).

L'algorithme génétique (GA : Genetic Algorithm) repose sur les principes de l'évolution génétique darwinienne et utilise des opérateurs génétiques tels que la sélection, la mutation, l'inversion et le croisement pour déterminer la solution optimale à un problème donné, comme le démontrent (Smaali *et al.*, 2021 ; Yahya *et al.*, 2020). Ce processus est communément désigné comme la fonction de fitness, comme expliqué par Ghaedi et Vafaei (2017). Ce processus est exécuté de manière itérative à travers plusieurs générations pour produire les chromosomes les plus robustes, qui représentent les solutions ou les paramètres opérationnels optimaux pour le bioprocessus examiné. L'algorithme génétique (GA) sert d'optimiseur évolutif et adaptatif efficace, souvent intégré aux réseaux de neurones artificiels (ANNs). Il permet de déterminer les paramètres opérationnels optimaux précis ou approximatifs pour une cible spécifique et unique. Cette intégration permet d'obtenir des performances satisfaisantes tout en réduisant simultanément la complexité des ANNs, comme le démontrent Fan *et al.* en 2018.

Les capacités exceptionnelles de généralisation des ANNs, ainsi que leur capacité à gérer le bruit, leur permettent d'anticiper avec précision les résultats pour de nouveaux ensembles de données d'entrée. Dans un espace de grande dimension, ils apprennent des modèles et anticipent les conséquences des problèmes (Nguyen *et al.*, 2021).

L'utilisation des ANNs en biotechnologie microbienne pour créer des modèles, est rarement citée dans la littérature. Les modèles basés sur les ANNs présentent certains avantages par rapport aux méthodes traditionnelles, notamment la capacité de prévoir et d'optimiser n'importe quels paramètres de processus de données complexes (Desai *et al.*, 2008). Les ANNs peuvent être créés sans connaissance préalable, peuvent gérer des données incomplètes des matériaux d'entrée et de sortie et ne nécessitent pas de description mathématique du phénomène étudié (Azizi *et al.*, 2016). Ainsi, cette approche génère des prédictions appropriées des meilleures méthodes de biotraitement (Dhanarajan *et al.*, 2014; Mourabet *et al.*, 2014 ; Aghaeinejad-Meybodi *et al.*, 2019).

2.7- Lipopeptides (LP)

Les LP, ou lipopeptides microbiens, se composent à la fois d'une partie polaire et d'une partie apolaire dans leur structure amphiphile. La portion polaire est constituée d'un peptide cyclique, tandis que la partie apolaire consiste en un acide gras linéaire ou ramifié présentant différentes longueurs et niveaux d'oxydation (Ahimou *et al.*, 2000). Ces lipopeptides ont été extraits d'un éventail de genres bactériens, tant Gram-positifs (tels que *Bacillus* ou *Streptomyces*), Gram-négatifs (comme *Pseudomonas*) que Gram-variable (notamment *Paenibacillus*), ainsi que de divers genres fongiques tels que *Phoma* et *Emericella* (Kauffman *et al.*, 2007 ; Bekiesch *et al.*, 2020). La nature amphiphile des LP leur donne des capacités émulsifiantes largement exploitées dans l'industrie biotechnologique (Raaijmakers *et al.*, 2010). Les LP peuvent adopter une forme linéaire ou cyclique. Jusqu'à présent, les LP cycliques sont considérés comme le groupe le plus actif sur le plan biologique, tandis que la recherche sur les LP linéaires est limitée (Patel *et al.*, 2015 ; Tran *et al.*, 2020). La macrocyclisation est une caractéristique répandue de nombreux produits naturels (Kopp *et al.*, 2007) ; dans le cas des LP, ce processus se produit à la dernière étape de la synthèse et il est catalysé par un domaine thioestérase C-terminal (Te) (Roongsawang *et al.*, 2007, 2010). La macrocyclisation des LP est une stratégie visant à assurer leur stabilité structurale et leur bioactivité (Hamley 2016). Comparés à leurs homologues linéaires, les LP cycliques présentent une plus grande stabilité physico-chimique ((Kopp *et al.*, 2007), avec un nombre réduit de conformations structurales potentielles qu'une molécule peut adopter (De Araujo *et al.*, 2011). La macrocyclisation confère une protection contre la dégradation par les exo et endoprotéases (White *et al.*, 2011), et permet aux LP d'être correctement orientés pour interagir avec leur cible (Kopp *et al.*, 2007).

Les LP sont produits par biosynthèse à travers des voies de métabolites secondaires. Les enzymes qui les fabriquent sont codées par des grappes de gènes biosynthétiques (BGC : Biosynthetic Gene Clusters), des ensembles organisés de deux gènes ou plus, comprenant des éléments de régulation (Martinet *et al.*, 2020). Pour les LP, cette synthèse est principalement assurée par des synthétases peptidiques non ribosomiques (NRPS : Non-Ribosomal Peptide Synthetases) et des synthétases hybrides NRPS-PKS (PKS : PolyKetide Synthetase), deux types de grosses protéines multi-modulaires et multi-domaines (Patel *et al.*, 2015 ; Tran *et al.*, 2020). Chaque module NRPS comprend au moins trois domaines catalytiques : un domaine d'adénylation (A), un domaine de protéine porteuse peptidique (PCP : Peptide Carrier Protein) et un domaine de condensation (C) (Kearns *et al.*, 2010). Une grande variété de NRPS a été

identifiée, principalement dans les phylums bactériens *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Firmicutes* et *Cyanobacteria* (Müller *et al.*, 2015). Cependant, de nombreux autres groupes ont été découverts portant les gènes nécessaires à la synthèse de NRPS, notamment *Deinococcus-Thermus*, *Chlorobi*, *Verrucomicrobia* et *Gemmatimonadetes* (Wang *et al.*, 2014).

Les LP sont largement utilisés dans divers secteurs industriels tels que la pharmacie (Khan *et al.*, 2016 ; Schultz *et al.*, 2020), l'agroalimentaire (Meena *et al.*, 2015), la cosmétique (Hamley, 2016) , l'agriculture (Penha *et al.*, 2020), ainsi que dans la dépollution des métaux lourds et des hydrocarbures (Bezza *et al.*, 2015). Les LP montrent une variété de bioactivités incluant des propriétés antimicrobiennes (Heerklotz *et al.*, 2007), immunomodulatrices (kelesidis *et al.*, 2014), antitumorales (Wu *et al.*, 2017) et tensioactives (Desai et Banat, 1997). Aussi, les biosurfactants à base de LP, produits par des micro-organismes, offrent plusieurs avantages par rapport aux surfactants synthétiques : ils sont biodégradables, efficaces à de faibles concentrations, peu toxiques, et leur utilisation dans les produits cosmétiques réduit le risque d'allergies et d'irritations cutanées (Akbari *et al.*, 2018). De plus, ces biosurfactants conservent leur efficacité sur une large plage de températures, de pH et de salinité (Geissler *et al.*, 2019).

2.7.1- Les Surfactines

Les surfactines ont été découverts par Arima *et al.* en 1968 comme étant des biosurfactants produits par *Bacillus*. Il s'agit d'un heptapeptide cyclique fermé comprenant une chaîne d'acide gras β -hydroxy. Cette structure confère à la surfactine des propriétés amphiphiles, lui donnant ainsi une activité tensioactive ainsi que diverses activités biologiques. Sa conformation en "selle de cheval" lorsqu'elle est en solution, amplifie ses activités. La biosynthèse des surfactines est catalysée par un grand complexe multienzymatique non ribosomal composé de quatre blocs de construction modulaire : SrfAA, SrfAB, SrfAC, SrfAD (Tsan *et al.*, 1977).

La séquence classique de la surfactine est L-Glu-L-Leu-D-Leu-L-Val-L-Asp-D-Leu-L-Leu (Shao *et al.*, 2015). Cependant, il existe des homologues qui se distinguent par leur séquence peptidique tout en appartenant à la famille des surfactines. Parmi eux, on trouve la lichenysine, qui remplace l'acide glutamique par un résidu de glutamine en position 1. La pumilacidine, quant à elle, présente un résidu de leucine en position 4 et un résidu d'isoleucine en position 7, au lieu d'un résidu de valine et d'un résidu de leucine. Des variantes peuvent être naturellement obtenues par des souches spécifiques, par la non-spécificité du domaine A, par une absence de cyclisation ou par une linéarisation du lipopeptide (Kowall *et al.*, 1998 ;

Shao *et al.*, 2015). En plus des modifications de la chaîne peptidique, il est également possible d'observer une variation de la longueur de la chaîne d'acide gras, allant de 12 à 17 atomes de carbone, ainsi que de son isomérisation n, iso ou anteiso (Théâtre *et al.*, 2022). La figure 6 illustre la structure de la surfactine.

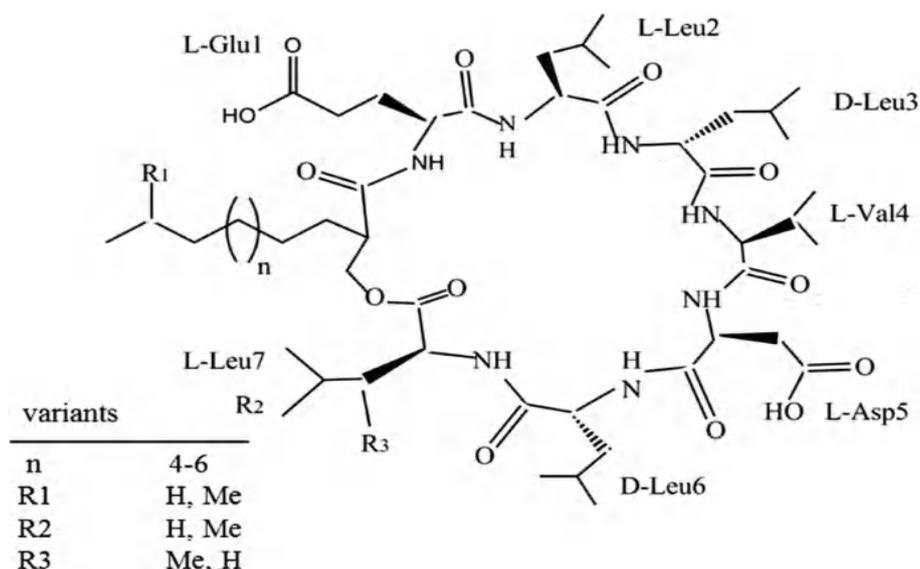


Figure 6 Structure de la surfactine (krass *et al.*, 2010).

2.7.2- Les fengycines

Les fengycines ou plipastatines sont des lipodécapétides cycliques contenant un acide gras β -hydroxylé avec une chaîne latérale de 14 à 19 atomes de carbone (Figure 7). La fengycine est synthétisée de manière non ribosomique par cinq enzymes synthétases de fengycine : FenC, FenD, FenE, FenA et FenB. Chaque enzyme est composée d'un ou de plusieurs modules, chacun divisé en plusieurs domaines (Wu *et al.*, 2007). Les trois premières enzymes contiennent chacune deux modules. FenC comprend FenC1 et FenC2, qui activent respectivement l'acide glutamique et l'ornithine (Lin *et al.*, 1999). L'enzyme FenD contient FenD1 et FenD2, qui activent respectivement L-Tyr et L-Thr. L'acide aminé L-Thr est ensuite converti en D-allo-Thr (Lin *et al.*, 2005). FenE contient FenE1, qui active un nouvel acide glutamique, et FenE2, qui est moins spécifique et permet la formation de deux fengycines différentes. FenE2 peut activer la valine pour produire de la fengycine B, ou elle peut activer l'alanine pour produire de la fengycine A (Shu *et al.*, 2002). L'enzyme FenA est quant à elle, constituée de trois modules : FenA1, FenA2 et FenA3. Ils activent respectivement une proline, une glutamine et une tyrosine (Théâtre *et al.*, 2022). Enfin, FenB est impliquée dans l'activation du dernier acide aminé, l'isoleucine, et dans la libération de la molécule de

fengycine. Elle est également responsable de la formation d'une liaison ester entre le troisième et le dernier acide aminé, favorisant ainsi la formation d'un cycle lactone (Lin *et al.*, 1999).

Les fengycines sont produites sous forme d'un mélange d'isoformes dont la composition en acides aminés de la fraction peptidique varie, tout comme la longueur et la ramification de l'acide gras β -hydroxylé. Les conditions de culture de la souche peuvent également influencer la quantité et la structure des lipopeptides produits (Yaseen *et al.*, 2016).

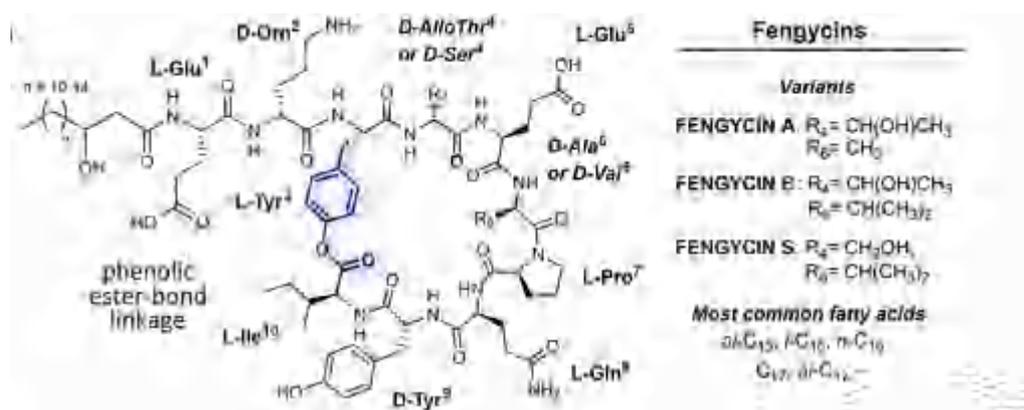


Figure 7 Structure générale des fengycine (Gimenez *et al.*, 2021)

2.7.3- Les iturines

La famille des iturines se compose de lipopeptides liés à un acide gras β -aminé et une chaîne carbonée de 14 à 17 atomes de carbone (Yang *et al.*, 2015) (Figure 8). Bien qu'il existe différents homologues de lipopeptides au sein de la famille des iturines, ils partagent deux caractéristiques communes. Tous les composés de cette famille ont une séquence chirale LDDLLDL, avec les trois mêmes premiers acides aminés : Asn, Tyr et Asn. Les iturines, les mycosubtilines et les bacillomycines sont inclus dans la famille des iturines (Tsug *et al.*, 2001). Les quatre derniers acides aminés ainsi que l'opéron codant pour le lipopeptide déterminent le type spécifique d'iturine produit. De plus, la classification de chaque molécule dépend également de la longueur de la chaîne d'acides gras (Peypoux *et al.*, 1981).

Comme mentionné précédemment, la synthèse des iturines nécessite l'intervention des polykétide synthases (PKS) par le biais des synthétases non ribosomiques (NRPS). Toutefois, les opérons varieront en fonction du lipopeptide produit. Par exemple, l'opéron responsable de la synthèse de l'iturine A comprend quatre gènes : ituD, ituA, ituB et ituC. Le gène ituD est spécifique à l'iturine A car il code pour une malonyl coenzyme A transacylase putative (Tsug *et*

Cette technique permet d'observer en temps réel, les interactions entre les agents de biocontrôle et les pathogènes au niveau cellulaire. Elle permet également de visualiser la localisation des agents de biocontrôle dans les tissus végétaux et de comprendre comment ils interagissent avec les structures pathogènes, comme les hyphes fongiques ou les structures bactériennes. Ainsi, l'utilisation de la microscopie épifluorescente offre des informations précieuses sur les mécanismes impliqués dans la lutte contre les pathogènes et permet d'optimiser l'efficacité des stratégies de biocontrôle dans la protection des cultures.

Le processus à la base de la fluorescence implique l'absorption de l'énergie lumineuse (un photon) par un indicateur, suivie de l'émission d'une partie de cette énergie lumineuse (sous la forme d'un autre photon) quelques nanosecondes plus tard. Étant donné qu'une partie de l'énergie est perdue au cours de ce processus, le photon émis a moins d'énergie que le photon absorbé. La lumière de courte longueur d'onde (vers le bleu) a plus d'énergie que la lumière de grande longueur d'onde (vers le rouge). Par conséquent, la lumière émise par un indicateur a généralement une longueur d'onde plus grande que celle de la lumière absorbée (excitation). Ce changement s'appelle le décalage de Stokes (Sanderson *et al.*, 2014).

2.9- Molécules à effet PGPR

Les bactéries présentes dans la rhizosphère, agissant de manière bénéfique sur la croissance des plantes hôtes, sont désignées sous le terme de rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes de l'anglais Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) (Raza *et al.*, 2016). Elles comprennent des bactéries qui résident dans la rhizosphère et améliorent la santé des plantes, contribuant ainsi à augmenter leur croissance. La majorité des PGPR crédibles appartiennent aux genres *Bacillus*, *Acinetobacter*, *Agrobacterium*, *Arthobacter*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Burkholderia*, *Bradyrhizobium*, *Rhizobium*, *Frankia*, *Serratia*, *Thiobacillus* et *Pseudomonads* (Glick, 1995 ; Vessey, 2003). Au cours des dix dernières années, le rôle de la rhizosphère en tant que niche écologique dans le fonctionnement de la biosphère, a permis aux PGPR de gagner en importance, ce qui a finalement favorisé les recherches visant à comprendre les mécanismes des PGPR dans la rhizosphère. Une rhizobactérie putative est qualifiée de PGPR lorsqu'elle est capable de produire un effet positif sur la plante lors de l'inoculation, démontrant ainsi de bonnes capacités concurrentielles par rapport aux communautés rhizosphériques existantes. En général, environ 2 à 5 % des bactéries de la rhizosphère sont des PGPR (Antoun et Prévost, 2006 ; Sgroj *et al.*, 2009, Jha

et al., 2010). L'échange d'ions est l'un des mécanismes par lesquels les bactéries sont adsorbées sur les particules du sol. On dit d'un sol qu'il est naturellement fertile lorsque les organismes de celui-ci libèrent des nutriments inorganiques à partir des réserves organiques à un rythme suffisant pour assurer une croissance rapide des plantes.

L'utilisation croissante des technologies microbiennes en agriculture, découle principalement de l'identification rapide de nouvelles souches bactériennes efficaces pour stimuler la croissance des plantes. Les microorganismes présents dans la rhizosphère exercent divers effets sur les plantes, influençant ainsi leur développement global. En effet, ces microorganismes peuvent renforcer la compétitivité de celles-ci et améliorer leur capacité à répondre aux stress environnementaux (Klopper *et al.*, 2015). Par exemple, l'inoculation de plantes stressées avec des souches PGPR permet de réduire les effets du stress salin et hydrique, favorise la germination des graines, stabilise les membranes des plantules et active les systèmes enzymatiques antioxydants, tous ces paramètres étant étroitement liés à la tolérance des plantes au stress abiotique (Mouradi *et al.*, 2016). Les microorganismes halotolérants, comme diverses espèces de *Bacillus*, d'*Azospirillum*, *Pseudomonas* et *Rhizobium*, accumulent des osmoprotecteurs tels que la proline et la glycine bêtaïne pour se protéger contre le stress oxydatif, notamment dans les environnements salins. Ainsi, la croissance de ces microorganismes associés aux racines des plantes peut contribuer à améliorer la fertilité des sols salins (Ait Bessai *et al.*, 2023). Ces rhizobactéries colonisent de manière compétitive le système racinaire des plantes et favorisent leur croissance grâce à différents mécanismes. Parmi ceux-ci, on compte la solubilisation des phosphates (Ahemad et Khan, 2012), la fixation de l'azote (Glick, 2012), la production d'Acide Indole-3-Acétique (AIA), de sidérophores (Jahanian *et al.*, 2012), d'Amino-Cyclopropane-1-Carboxylate (ACC) désaminase, ainsi que la production de cyanure d'hydrogène (HCN), de phytohormones, d'antibiotiques ou d'enzymes lytiques (Xie *et al.*, 2016).

De plus, l'utilisation de PGPR en tant que biofertilisant et/ou antagoniste contre les phytopathogènes représente une alternative prometteuse aux engrais chimiques et aux pesticides conventionnels (Egamberdieva et Lugtenberg, 2014).

L'utilisation des microorganismes pour dégrader la biomasse ligno-cellulosique et agir comme agents de biocontrôle représente un pivot vers des pratiques agricoles plus durables et respectueuses de l'environnement (Ellen *et al.*, 2019). Cette approche intégrée révolutionne la manière avec laquelle sont perçus et gérés les systèmes agricoles, en exploitant le potentiel des microorganismes pour créer des écosystèmes agricoles équilibrés et résilients.

Premièrement, en décomposant la biomasse ligno-cellulosique, ces microorganismes transforment des déchets agricoles en ressources précieuses. Plutôt que de les considérer comme des déchets à éliminer, cette approche les valorise comme des matières premières potentielles pour la production d'énergie, de compost ou de bioproduits. Cela réduit la dépendance aux ressources non renouvelables et contribue à la construction d'une économie circulaire où les déchets sont transformés en nouvelles opportunités (Pretty *et al.*, 2011).

Deuxièmement, en agissant comme agents de biocontrôle, ces microorganismes offrent une alternative durable aux pesticides chimiques. En favorisant des équilibres écologiques dans les sols et en supprimant naturellement les pathogènes et les ravageurs, ils préservent la santé des cultures tout en réduisant les risques pour la santé humaine et l'environnement associés à l'utilisation intensive de produits chimiques. En outre, cette approche favorise la régénération des sols en améliorant leur structure, leur fertilité et leur capacité de rétention d'eau. Les microorganismes dégradent la matière organique, libérant des éléments nutritifs essentiels pour les plantes et favorisant ainsi une agriculture plus productive et durable à long terme. Enfin, en promouvant la biodiversité et la résilience des écosystèmes agricoles, cette approche contribue à la préservation de la santé globale de la biosphère. Les sols sains et riches en biodiversité sont moins sujets à l'érosion, à la dégradation et aux maladies des plantes, créant ainsi des systèmes agricoles plus stables et adaptatifs face aux défis environnementaux et climatiques (Bardgett *et al.*, 2014 ; Lal 2015). En synthétisant ces concepts, l'agriculture circulaire offre une feuille de route pour une transformation durable des systèmes agricoles.

Elle met en lumière l'importance des microorganismes dans la création de solutions innovantes et respectueuses de l'environnement pour répondre aux défis actuels de l'agriculture mondiale.

Matériel et méthodes

3-Matériel et méthodes

Le présent travail porte sur la valorisation de la biomasse ligno-cellulosique comme milieu de fermentation et d'isolement de microorganismes développant des potentialités de biocontrôle appliquées en Agriculture. En effet, ce travail s'inscrit dans le cadre de l'économie circulaire et du développement durable. L'intérêt pour les microorganismes de biocontrôle découle de leur capacité à protéger les plantes contre les pathogènes et à stimuler leur croissance. L'utilisation de la biomasse ligno-cellulosique comme substrat dans les processus de fermentation offre une double valorisation : d'une part, la gestion durable des déchets, et d'autre part, la production de bioagents bénéfiques pour l'Agriculture. Le développement de cette étude a eu lieu au sein du Laboratoire de Mycologie, de Biotechnologie et de l'Activité Microbienne (LAMyBAM), Université Frère Mentouri, Constantine 1, Algérie, et au niveau du laboratoire de Microbiologie Appliquée, Université libre de Bruxelles, Belgique.

3.1- Isolement des microorganismes à partir d'échantillons riches en matière ligno-cellulosique

L'échantillon du sol et du bois de l'arbre de pin de la forêt d'El Baaraouia, ainsi que des noix et des amandes achetées sur le marché de légumes de la région de Constantine, dans l'Est Algérien, représentent une approche stratégique pour isoler des microorganismes susceptibles de dégrader la matière ligno-cellulosique. Ces échantillons sont sélectionnés pour leur richesse en composés ligno-cellulosiques tels que ; la cellulose, l'hémicellulose et la lignine, qui constituent une source nutritive essentielle pour de nombreux microorganismes. De plus, la forêt d'El Baaraouia est caractérisée par des conditions environnementales partiellement extrêmes, notamment une salinité et des températures relativement élevées. En isolant les microorganismes présents dans ces échantillons, nous pouvons identifier des souches potentiellement bénéfiques. Les différents échantillons sont illustrés sur la figure 9.

Dans le but d'isoler des microorganismes à partir de sol, un gramme de chaque échantillon a été mis en suspension dans 9 mL d'eau physiologique stérile et agité vigoureusement pendant 2 min, puis des dilutions décimales (de 10^{-1} à 10^{-8}) ont été étalées sur les milieux Luria-Bertani et Sabouraud. Les boîtes de Petri ont été incubées à 30°C pendant 24 h. Alors que l'isolement à partir du bois a été réalisé en déposant des fragments de celui-ci préalablement rincé avec une solution d'hypochlorite de sodium à 0,1% pendant une durée de 2 minutes, à la surface des boîtes de Petri contenant le milieu gélosé. Les boîtes ont été ensuite incubées à une température de 25°C pendant une période de 7 jours. La purification

des cultures a été obtenue par le biais de plusieurs repiquages successifs. La même méthode a été effectuée pour l'isolement de microorganismes à partir des coques d'amandes et de noix (Attrassi *et al.*, 2007).

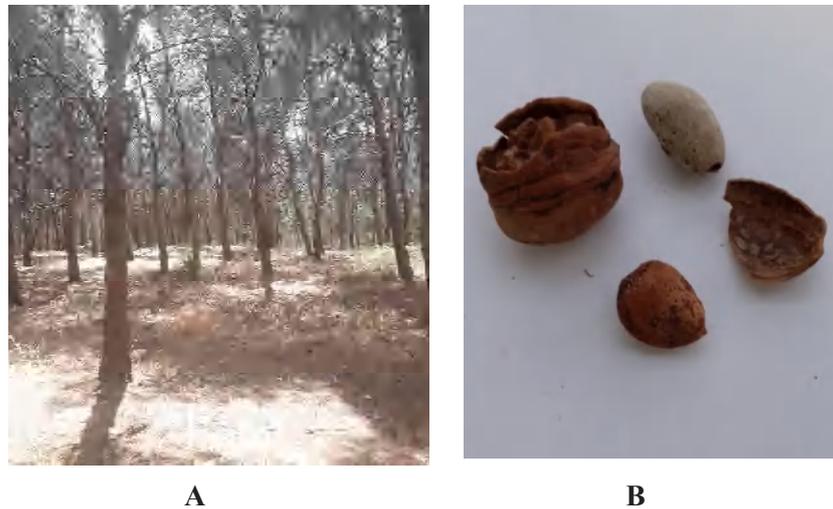


Figure 9 Echantillonnage : **A**, Sol et bois de l'arbre de pin ; **B**, Coques de noix et d'amandes.

3.2- Sélection des microorganismes dégradant la matière ligno-cellulosique

Afin de sélectionner des microorganismes dégradant la matière ligno-cellulosique, des tests enzymatiques en l'occurrence, la cellulase, la xylanase et laccase ont été réalisés.

L'activité cellulosique a été effectuée sur des cylindres de gélose, contenant une culture microbienne. Ils ont été déposés à la surface du milieu Carboxy Méthyl Cellulose (CMC) (Annexe 1). Après 5 jours d'incubation à 30°C, la libération de cellulase est réalisée par noyage des boîtes de Petri au moyen d'une solution de rouge Congo (0,1%) qui se fixe préférentiellement sur les polymères cellulosiques. La réaction de liaison dure 30 min, suivie d'un lavage avec une solution de NaCl (1M) pendant 5 min. L'activité cellulase est mise en évidence par l'apparition d'une zone claire autour des colonies productrices de l'enzyme qui dégradent la cellulose (Oikawa *et al.*, 1998).

L'activité xylanasiq, a été réalisée sur un cylindre d'agar contenant la culture bactérienne. Elle a été déposée sur milieu à base de 4% de xylane (XMB) (Annexe 1). Après incubation pendant 5 jours à 30°C, la révélation est réalisée par noyage des boîtes de Petri avec une solution de rouge Congo pendant 30 min suivi d'un rinçage avec une solution de NaCl (1M) pendant 5min. L'apparition d'un halo clair autour de la colonie bactérienne indique une dégradation de xylane par les xylanases sécrétées par la souche bactérienne (Nommori *et al.*, 1990).

L'activité laccasique a été mise en évidence par la culture de la souche bactérienne sélectionnée sur milieu lignine à base de 0.1 % gaïacol (LMBG) (Annexe 1). Le gaïacol, composé de monométhoxybenzène de phénol, a été utilisé comme substrat pour induire l'activité laccasique. Après une incubation à 30°C pendant 24h, une couleur brune rougeâtre intense se développe autour des colonies bactériennes indiquant l'oxydation du gaïacol et la présence de laccase (Kumar et Mishra, 2011).

3.3- Sélection des microorganismes développant des potentialités de biocontrôle

3.3.1- Isolement des agents pathogènes infectant la tomate

Dans ce travail, nous nous sommes intéressés à la maladie touchant la tomate par des agents pathogènes infectant cette dernière à savoir les genres ; *Alternaria* et *Fusarium*. Ce choix a été justifié par le fait que la tomate est l'un des acteurs majeurs de l'économie agricole algérienne et considéré comme l'une des cultures prioritaires avec une superficie totale avoisinant les 22 646 hectares. De plus, les genres *Alternaria* et *Fusarium* causent des symptômes très graves et très variés qui affectent considérablement le rendement de la tomate (FAO, 2014).

Dans cette présente étude, l'isolement d'*Alternaria* (Alt) a été effectué comme suit ; les parties de la tomate infectées ont été, préalablement, découpées puis nettoyées par immersion dans une solution d'hypochlorite de sodium à 0,1% pendant une durée de 2 minutes. Ensuite, ces fragments ont été déposés sur le milieu PDA (Potato Dextrose Agar) (Annexe 1) coulé dans des boîtes de Petri, puis, incubées à une température de 25°C pendant une période de 7 jours. La purification des cultures a été obtenue par le biais de plusieurs repiquages successifs (Attrassi *et al.*, 2007). Tandis que le Genre *Fusarium* (F1) a été fourni par le Laboratoire de Mycologie, de Biotechnologie et de l'Activité Microbienne.

3.3.2- Identification des agents pathogènes infectant la tomate

Les agents pathogènes *Fusarium* (F1) et *Alternaria* (Alt), ont été identifiés préalablement par des examens macroscopiques et microscopiques puis par la voie moléculaire en analysant les séquences d'*ADN ITS*.

3.3.2.1- Examen macroscopique

L'aspect macroscopique consiste à observer à l'œil nu la croissance, la couleur des colonies et sa variation en fonction du temps, la texture de la surface, la couleur du revers des boîtes et le changement de la couleur du milieu utilisé (Botton *et al.*, 1990).

3.3.2.1- Examen microscopique

L'objectif de l'analyse microscopique du mycélium est de déterminer la présence ou l'absence de cloisons, ainsi que d'examiner la couleur, la fructification et la forme des spores. Ces éléments sont observés au microscope optique à un grossissement de X40. En effet, un fragment de ruban adhésif est utilisé pour prélever un échantillon de la colonie âgée de sept jours à l'aide d'une pince, puis déposé sur une lame porte-objet pour être observé au microscope (Lachapelle, 2004). L'observation microscopique à épifluorescence a été réalisée en cultivant *Fusarium* (F1) sur milieu PDA et incubé à 30°C pendant 7 jours. Pour préparer la solution sporale de *Fusarium* (F1), 20 mL d'eau physiologique stérile ont été ajoutés à chaque boîte de Petri. Ensuite, la surface de chaque culture chargée de conidies a été stérilement grattée à l'aide d'une pipette Pasteur (Hariprasard et Niranjana, 2008). Les solutions de spores ainsi obtenues ont été vigoureusement mélangées pendant une minute à l'aide d'un vortex et ajustées à une concentration de 5×10^6 spores/mL. L'observation microscopique à épifluorescence a été réalisée à l'aide du microscope *Nikon Eclipse Ci* (Nikon Corporation, Japon).

3.3.2.2-Identification moléculaire

L'identification moléculaire a été effectuée selon le protocole établi par le Laboratoire GENE LIFE SCIENCES (Sidi Bel Abbes, Algérie) : l'extraction d'ADN a été réalisée par l'utilisation d'un kit commercial Nucleo Spin Plant II (Macherey-Nagel Germany). Les amorces utilisées pour la caractérisation moléculaire sont données dans le tableau 3.

Tableau 3 Amorces utilisées pour la caractérisation moléculaire

Nom	Séquencé 5'-3'	Tm	Taille fragment	sources
ITS1	CTT GGT CAT TTA GAG GAA GTA A	55	600bp	Gardes et Bruns, 1993)
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	55		
EF-728F	CATYGAGAAGTTCGAGAAGG	52	450bp	Carbone et Kohn, 1999)
EF-2	GGARGTACCAGTSATCATGTT	52		

Les produits d'amplification ont été révélés après une électrophorèse sur gel d'agarose à 1,5% d'un dépôt de 10µl de produits de PCR. La migration est suivie d'une coloration dans un bain de bromure d'éthidium (0,5µg/mL). L'ADN a été ensuite visualisé et photographié sous UV par l'utilisation du Gel doc système de Biorad (USA). Les produits PCR ont été

purifiés par le kit NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up de Macherey- Nagel (Germany). Les produits PCR isolés et purifiés ont été séquencés par la technique de Sanger (Sanger *et al.*, 1977) en utilisant le kit BigDye v3.1 d'Applied Biosystems et les amorces PCR utilisées pour l'amplification des fragments d'intérêt.

Les séquences obtenues ont été analysées et nettoyées par l'utilisation du logiciel CHROMAS PRO. Les séquences finales sont alors comparées avec celles de la banque de données GeneBank par l'utilisation du Programme BLAST de NCBI pour l'identification des isolats étudiés en nous basant sur le pourcentage de similarité avec les souches de références.

3.3.3- Sélection des isolats antagonistes : Test d'antagonisme *in vitro*

Il est à noter que la capacité de l'isolat bactérien (M4) et l'isolat fongique (P2L), obtenus à partir du sol et des coques des noix, respectivement, et qui montrent un résultat positif concernant la dégradation de la matière ligno-cellulosique ont été sélectionnés pour réaliser les tests d'antagonismes.

a- Confrontation directe bactérie-champignons

L'antagonisme de l'isolat bactérien sélectionné (M4) vis-à-vis des phytopathogènes a été réalisé *in vitro* sur le milieu PDA en utilisant la méthode de confrontation directe. En effet, des disques de gélose de la culture fongique étudiée ont été déposés sur la boîte de Petri à 3 cm de distance de chaque point de culture bactérienne. Les boîtes de Petri ont été incubées à 30°C pendant 7 jours. Le pourcentage d'inhibition de la croissance fongique a été calculé par la formule suivante (Trivaldi *et al.*, 2008) :

$$\frac{C_t - C}{C_t} \times 100$$

C_t : Croissance des champignons en absence de l'antagoniste

C : Croissance des champignons en présence de l'antagoniste

b- Confrontation directe champignon-champignons

L'effet antagoniste de l'isolat fongique sélectionné (P2L) contre les phytopathogènes a été évalué *in vitro* en utilisant la méthode de confrontation directe sur milieu PDA. Pour ce faire, des disques de gélose contenant la culture fongique étudiée ont été placés à une distance de 3

cm des points de culture fongique sur des boîtes de Petri. Les boîtes de Petri ont ensuite été incubées à 30°C pendant 7 jours.

Le pourcentage d'inhibition de la croissance fongique a été calculé par la formule suivante (Hmouni *et al.*, 1996) :

$$\frac{1 - D_n}{D_o} \times 100$$

D_n : Diamètre moyen du champignon pathogène en présence de l'antagoniste.

D_o : Diamètre moyen du champignon pathogène en absence de l'antagoniste.

3.3.4- Identifications des isolats antagonistes sélectionnés

3.3.4.1- Identification morphologique de l'isolat bactérien (M4)

Les caractéristiques macroscopiques des colonies, âgées de 24h, sont évaluées directement sur le milieu gélosé à l'œil nu, conformément au protocole de Guiraud (1998). Par ailleurs, l'analyse microscopique des bactéries isolées a englobé les techniques suivantes :

a-Observation à l'état frais

L'observation à l'état frais est effectuée pour la visualisation des bactéries vivantes, ainsi que la détermination de leur morphologie, de leur agencement cellulaire, et surtout, de leur éventuelle mobilité. Cette méthode implique le dépôt d'une goutte d'eau distillée ou d'eau physiologique stérile sur une lamelle, suivie de l'ajout et de la dissociation d'un échantillon bactérien prélevé sur la colonie à observer dans cette goutte. Ensuite, une lame creuse est placée sur la lamelle pour former une goutte suspendue, et l'observation est effectuée au grossissement (X40 puis à immersion) (Singleton, 2005).

b-Coloration de Gram

La coloration de Gram (Annexe 2) est effectuée en prélevant un échantillon à partir d'une colonie âgée de 24h, puis fixé à la chaleur. Il est ensuite recouvert de violet de Gentiane pendant une minute, suivi par l'élimination de ce colorant en ajoutant du Lugol pendant une minute. Le frottis est décoloré avec de l'éthanol (environ 20 secondes). Enfin, une contre-coloration est réalisée avec de la Fuchsine conformément au protocole de Madigan et Martinko (2007). L'observation est effectuée au grossissement X40.

Les observations macroscopiques et microscopiques mentionnées précédemment ont montré que l'isolat bactérien (M4) peut développer des endospores. Cela souligne l'importance de réaliser les tests suivants :

c-Test de catalase

Le test de catalase est utilisé pour identifier la présence de l'enzyme catalase dans la bactérie, qui catalyse la transformation de l'eau oxygénée en eau et en oxygène. Cette enzyme est détectée en mettant la culture bactérienne en contact avec une solution d'eau oxygénée. Une réaction positive se manifeste par l'apparition de bulles (Singleton, 2005).

d-Test de sporulation

Le test de sporulation permet de confirmer la présence de structures sporales. Les cultures bactériennes sont réalisées dans des fioles contenant le milieu LB (Annexe 1), puis incubées à 30°C pendant 24h. Des dilutions sont effectuées dans de l'eau physiologique à partir des cultures précédentes, puis chauffées dans un bain-marie à 80°C pendant 12 min. Ensuite, 1 ml de chaque dilution est ensemencé sur de la gélose nutritive en boîte. La lecture est effectuée après incubation à 30°C pendant 24 à 48h.

3.3.4.2- Identification morphologique de l'isolat (P2L)

L'examen macroscopique des colonies est observé directement sur la gélose à l'œil nu et/ou à l'aide du grossissement X4 (Guiraud, 1998). Par ailleurs, l'examen microscopique du mycélium pour déterminer la présence ou l'absence de cloisons, ainsi que l'observation de la couleur, la fructification et la forme des spores sont observés au microscope optique à un grossissement de X40, selon deux techniques distinctes :

- **Méthode du ruban adhésif**

Un fragment de ruban adhésif est utilisé pour prélever un échantillon de la colonie âgée de sept jours à l'aide d'une pince, puis déposé sur une lame porte-objet pour être observé au microscope (Lachapelle, 2004).

- **Méthode de coloration par le bleu de coton au lactophénol**

Un échantillon de la colonie âgée de sept jours est collecté à l'aide d'une anse de platine, puis déposé sur une lame porte-objet contenant une goutte de bleu de coton au lactophénol. Après chauffage, une lamelle couvre-objet est placée sur la préparation pour éliminer les bulles d'air, avant d'être observée au microscope (Lachapelle, 2004).

3.3.4.3- Identification moléculaire des isolats sélectionnés

L'identification moléculaire de l'isolat fongique (P2L) a été réalisée au niveau du Laboratoire de Mycologie de l'Université de Louvain en Belgique où les régions 26ITS de l'opéron ribosomal nucléaire ont été séquencées. Alors que l'identification de l'isolat

bactérien (M4) a été réalisée par séquençage de l'ADNr 16S selon le protocole fourni par le Laboratoire GENE LIFE SCIENCES (Sidi Bel Abbès, Algérie).

L'extraction de l'ADN génomique bactérien a été réalisée à l'aide du kit d'extraction d'acide nucléique GF-1 (Vivantis Technologies SdnBhd, Selangor DE, Malaisie) selon les instructions du fabricant. L'ADN extrait a été stocké à 4°C jusqu'à ce qu'il soit requis pour la PCR.

L'amplification par PCR a été archivée en utilisant le jeu d'amorces de 16SrRN Agene (27F : 5' - AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG - 3' et 1492r 5' - CCG TCA ATT CCT TTG AGT TT - 3') (Edward, *et al.*, 1989). Le Mélange réactionnel contient 1X tampon PCR (Solis Biodyne, Estonie), 1,5 mM de chlorure de magnésium (Solis Biodyne, Estonie), 0,2 mM de chaque DNTP (Solis Biodyne, Estonie) et 2 U *Taq* ADN polymérase (Solis Biodyne, Estonie). Le mélange de réaction PCR contient 25 µl de master mix (1,25 U *taq* d'ADN polymérase (Solis Biodyne, Estonie), 3 µl de matrice d'ADN, 5 µl de chaque amorce et complété jusqu'à 50 µl de volume réactionnel avec de l'H₂O distillée. Les séquences de PCR utilisées sont les suivantes : dénaturation initiale à 94°C (1 minute), anelage à 55°C (1 minute) et extension à 72°C (1 minute). L'amplification des gènes a été réalisée à l'aide d'un thermocycleur (Icycler Bio-Rad, USA). Une répétition en 30 cycles suivis d'une extension finale à 72°C (7 minutes) a été effectuée. Le produit PCR a été séparé sur un gel d'agarose à 1,5% (Sigma-Aldrich, USA). Une échelle d'ADN de cent paires de bases (100 pb) (Solis Biodyne, Estonie) a été utilisée comme marqueur de poids moléculaire d'ADN.

L'électrophorèse a été effectuée à 80 V pendant 1 h 30 min, et le gel a été visualisé sous lumière UV après coloration avec Midori Green Advance (Nippon Genetics, Japon) et inspecté avec un transilluminateur UV.

Les produits de PCR ont été soumis à une électrophorèse et purifiés (kit Clean-Up, Vivantis) ensuite envoyés à une agence de séquençage (Apical Scientific Sdn. Bhd.). Les séquences générées ont été analysées à l'aide de BLAST disponible sur NCBI web.

3.3.5- Etude de l'isolat bactérien sélectionné

Afin d'étudier l'isolat bactérien sélectionné, obtenu à partir du sol autour de l'arbre de pin, une approche méthodologique exhaustive est indispensable. Cela comprend une analyse pédologique du sol pour comprendre ses caractéristiques, sa structure et sa fertilité, ainsi qu'une étude climatologique du site de prélèvement pour prendre en compte les conditions environnementales. De plus, il est crucial d'examiner la physiologie de l'isolat et de le

caractériser sous différentes conditions du pH, de salinité et de température. Ces aspects sont détaillés dans les sections suivantes :

3.3.5.1-Eude pédologiques et climatologique

L'étude pédologique du sol autour de l'arbre du pin a été réalisée au niveau de l'Agence Nationale des Ressources Hydriques (ANRH, Zone Industrielle Palma, Constantine). Les paramètres analysés sont les suivants :

- Le pH
- La conductivité électrique
- Le pourcentage de saturation
- Les substances minérales (CO_3H^- , SO_4^{--} , Cl^- , Ca^{++} , Mg^{++} , Na^+ , K^+).

Les échantillons de sol ont été prélevés durant le mois de Juillet 2018. Par conséquent, des données météorologiques et climatologiques des sites de prélèvement ont également été étudiées durant cette période (année 2018).

3.3.5.2- Caractérisation de l'isolat bactérien sélectionné

3.3.5.2.1- Courbe de croissance

La courbe de croissance est nécessaire pour suivre la cinétique du microorganisme et illustrer sa physiologie. Pour effectuer ce test, une pré-culture de la bactérie sélectionnée a été réalisée à partir des colonies jeunes âgées de 18 à 24 heures, puis inoculées dans une fiole de 250 mL contenant 100 mL de milieu de culture LB et incubée à 30°C pendant 18 heures.

Ensuite, 10 mL de la pré-culture ont servi à inoculer des fioles de 250 mL contenant 100 mL de milieu de culture LB, puis incubés à 30°C. Un prélèvement a été effectué chaque heure pour calculer le nombre de cellules/mL en traçant la courbe de croissance bactérienne.

3.3.5.2.2- Tolérance au sel, à la température et au pH

Etant donné que l'isolat bactérien sélectionné a été isolé à partir d'un milieu caractérisé par un environnement partiellement spécifique, la tolérance de cette bactérie à différentes températures, à différentes concentrations de sel et à différentes valeurs du pH, a été évaluée selon le protocole proposé par Cherif-Silini *et al.* (2012).

a-Tolérance à la température

Les cultures bactériennes de la souche sélectionnée ont été incubées après ensemencement sur milieu LB (Annexe 2) à différentes températures (25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 et 60°C). La croissance a été suivie après 24h d'incubation à 30°C.

b- Tolérance en sel

La capacité de la bactérie à tolérer différentes concentrations de sel a été étudiée en incubant les cultures de la souche sélectionnée dans du bouillon LB à différentes concentrations de NaCl (0 g/L, 20g/L, 40g/L, 60g/L, 80g/L, 100g/L et 200g/L). La croissance a été suivie après 72h d'incubation à 30°C selon le protocole.

c- Tolérance au pH

La capacité de la souche bactérienne à tolérer différentes valeurs du pH a été vérifiée en incubant le milieu LB ensemencé avec une culture bactérienne à différentes valeurs du pH (4, 7, 9, et 11). La croissance a été suivie après 24h d'incubation à 30°C.

3.3.6 - Etude de l'activité antagoniste de l'isolat bacterien (M4) *in vitro* en utilisant les surnageants de culture

Afin de tester l'effet antagoniste de *B. halotolerans in vitro* contre les agents phytopathogènes *F. napiforme* et *A. alternata*, deux tests ont été effectués : le surnageant du milieu synthétique Luria-Bertani (LB), et le surnageant du milieu naturel contenant la paille d'avoine comme seule source de carbone (MA). La paille d'avoine utilisée comme substrat de fermentation a été choisie pour sa richesse en biomasse ligno-cellulosique connue pour sa résistance à la dégradation d'une part et sa disponibilité en grandes quantités en Algérie d'autre part. Pour réaliser ce test, une pré-culture a été préparée, en prélevant des colonies jeunes âgées de 18 à 24h, puis incubée dans une fiole de 250 mL, contenant 100 mL du milieu de culture LB, à 30°C pendant 18h. 10 mL de cette pré-culture ont été ajoutés dans des fioles de 500 mL contenant 200 mL du milieu de culture LB et MA séparément. Les cultures ont été incubées pendant 72h à 30°C avec une agitation de 180 rpm.

Après fermentation, la culture a été centrifugée à 6000 rpm/20min afin de séparer les cellules du milieu de culture supposé contenir les molécules bioactives. Le surnageant obtenu a été filtré à travers des filtres millipores stériles de 0,22 µm de diamètre. Ensuite, des suspensions fongiques de F1 et Alt (5×10^5 spores/mL) ont été étalées à l'aide d'un écouvillon stérile sur des boîtes de Petri contenant la gélose Sabouraud. Après séchage (environ 5 minutes), des disques de 6 mm de diamètre de papier Wattman imbibés avec 10 µL de l'extrait à tester, sont séchés et déposés sur la surface des boîtes. Ces dernières, sont déposées à 4°C dans un réfrigérateur pendant 2h pour permettre une pré-diffusion des substances bioactives, puis incubées à 30°C pendant 3 jours (Tagg et Mc Given, 1971).

3.3.7- Modélisation

Le présent travail vise à étudier une approche mathématique qui permettrait la modélisation de l'activité antagoniste de *B. halotolerans* vis-à-vis de *F. napiforme* en fonction des différents facteurs expérimentaux (pH, concentration du substrat, température et temps d'incubation) et ce dans le but d'optimiser ces derniers pour obtenir une activité antagoniste plus élevée. Les modèles choisis sont le plan de Box-Behnken (BBD) à partir de la Méthode des Surfaces de Réponses (MSR) et les réseaux de neurones artificiels (ANNs) couplé à un algorithme génétique (GA).

3.3.7.1- Optimisation des facteurs physico-chimiques influant l'activité antagoniste de *B. halotolerans* à l'aide du plan de Box-Behnken (BBD)

Différentes concentrations d'avoine (1, 4 et 7 g) ont été réparties dans des erlenmeyers de 500 mL. Le pH a été ajusté à (4, 7,5 et 11). Toutes les préparations ont été autoclavées à 120°C pendant 20 min. La pré-culture a été obtenue en inoculant des colonies bactériennes dans des erlenmeyers de 250 mL contenant 100 mL du milieu MA et incubés à 30°C pendant 18h. Les erlenmeyers ont été inoculés par 10 mL de la culture bactérienne, les cultures ont été incubées à différentes températures (25, 40 et 50 C°) à différents temps d'incubation (16, 32 et 48h). Les facteurs ont été modifiés selon le plan d'expérience présenté dans le tableau 4. Toutes les cultures ont été incubées avec une agitation de 180 rpm.

Après fermentation, 50 mL prélevés de chaque erlenmeyer ont été centrifugés à 6000 rpm pendant 20 minutes afin de séparer les cellules du milieu de culture supposé contenir les molécules bioactives. Le surnageant obtenu a été filtré à travers des filtres millipore stériles de 0,22 µm de diamètre. Pour réaliser ce test, une suspension fongique de *Fusarium* (5×10^5 spores/mL) a été préparée puis étalée à l'aide d'un écouvillon stérile sur des boîtes de Petri contenant le milieu Sabouraud. Après séchage (environ 5 min), des disques de papier Wattman de 6 mm de diamètre imbibés de 10 µL de l'extrait à tester, sont séchés et placés à la surface des boîtes. Ces dernières sont placées à 4°C dans un réfrigérateur pendant 2h pour permettre une pré-diffusion des substances bioactives, puis incubées à 30°C pendant 3 jours (Tagg et Mc Given, 1971).

L'optimisation des facteurs physico-chimiques influant sur l'activité antagoniste de *B. halotolerans* à l'aide du plan de Box-Behnken (BBD) a été étudiée, afin de maximiser au

mieux, l'effet antagoniste de la souche bactérienne vis-à-vis du pathogène *Fusarium* (F1). Quatre paramètres ont été sélectionnés à savoir le pH, la concentration du substrat, la température et le temps d'incubation. Le tableau 4 présente le domaine d'étude avec les niveaux codés et les valeurs réelles des variables étudiées.

Tableau 4 Variables à différents niveaux.

Variables	Niveaux			Unité
	-1	0	+1	
X ₁ : pH	4	7.5	11	
X ₂ : Concentration du substrat	1	4	7	g
X ₃ : Température	25	40	55	C°
X ₄ : Temps d'incubation	16	32	48	h

X₁, X₂, X₃ et X₄ correspondent aux diverses variables d'impact tandis que "-1", "0" et "+1" correspondent aux trois niveaux

Le tableau 5 illustre les quatre variables indépendantes qui sont représentées en unités codées par la matrice Box-Behnken.

Tableau 5 Matrice Box-Behnken.

Essai	Valeur codée des facteurs indépendants				AA (mm)
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	Expérimental
1	0	-1	0	-1	12
2	0	1	0	1	9
3	1	0	1	0	2
4	0	0	0	0	18
5	1	0	-1	0	8
6	0	-1	-1	0	15
7	0	0	0	0	16
8	0	-1	1	0	9
9	0	1	0	-1	10
10	0	0	0	0	20
11	0	1	1	0	13
12	0	0	0	0	17
13	0	0	-1	1	2
14	-1	0	0	-1	12
15	-1	0	1	0	3
16	-1	0	0	1	10
17	0	0	1	-1	7
18	1	1	0	0	11
19	-1	-1	0	0	9
20	0	0	1	1	2
21	-1	1	0	0	15
22	0	0	-1	-1	9
23	-1	0	-1	0	6
24	1	-1	0	0	7
25	0	-1	0	1	9
26	0	1	-1	0	19
27	1	0	0	1	4
28	1	0	0	-1	6

-1 Bas niveau ; 0 valeur centrale ; +1 Haut niveau

AA : Activité Antagoniste

Chaque colonne correspond à une variable (facteur) et les lignes représentent les différentes expériences.

3.3.7.2- Plan de Box-Behnken (BBD) et méthode des surfaces de réponses (RSM)

Les quatre paramètres sélectionnés (pH, concentration du substrat, température et temps d'incubation) ont été soumis à une analyse RSM en utilisant le plan de Box-Behnken (Lanka et Latha, 2015). Le logiciel statistique Minitab 19.0 a permis d'optimiser la réponse et de corréler mathématiquement les variables indépendantes. Le BBD-RSM a généré vingt-huit expériences pour un BBD à quatre facteurs avec quatre points centraux. Tous les facteurs ont été évalués à trois niveaux (-1, 0 et +1), où 0 correspond à la valeur centrale codée, +1 est une valeur élevée et -1 est une valeur faible pour optimiser les facteurs clés (les valeurs réelles et codées sont indiquées dans les tableaux 4 et 5, respectivement).

Toutes les expériences ont été menées en trois exemplaires ; toutes les réponses ont été ajustées à un modèle polynomial indépendant du second ordre représenté par l'équation (1).

$$Y = a + \sum_{i=1}^n b_i X_i + \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n d_{ij} X_i X_j + \sum_{i=1}^n c_i X_i^2 \quad \text{Eq.1}$$

Où Y est la valeur prédite de la variable de sortie (activité antagoniste) et a est la constante polynomiale qui exprime l'effet moyen général, le premier terme rend compte des effets linéaires, le second terme des effets d'interaction et enfin le dernier terme rend compte des effets quadratiques. b_i , d_{ij} et c_i sont respectivement les coefficients linéaires, d'interaction et quadratiques. Les x_i sont des variables indépendantes codées $i = 1, 2, 3 \dots, n$.

La corrélation entre la valeur codée x_i pour X_i , qui représente la valeur réelle de la variable indépendante, est exprimée comme suit (Eq. 2) :

$$x_i = \frac{X_i - X_0}{\delta X} \quad \text{Eq.2}$$

X_0 représente la valeur réelle de la variable indépendante au point central du test, et la variation progressive de X_i est représentée par δX . L'équation de régression a également servi à calculer les valeurs prédites de la réponse. L'analyse de variance (ANOVA) a permis de résoudre la question de la compétence statistique du modèle. Les valeurs F et p évaluent l'importance des facteurs et du modèle de régression. Ainsi, le test de Student avec une faible valeur de p témoigne de la grande fiabilité du modèle de régression (Vasseghian *et al.*, 2020).

Le coefficient de détermination (R^2) avec la valeur ajustée (R_{adj}^2) a été utilisé pour évaluer statistiquement la précision et la fiabilité de l'équation du modèle polynomial.

L'élaboration de courbes de niveau permet d'élucider les corrélations entre les réponses et les niveaux expérimentaux de chaque variable indépendante. Par la suite, l'outil d'optimisation de la réponse du logiciel a désigné la meilleure valeur pour chaque variable afin d'obtenir le meilleur rendement de l'activité antagoniste.

3.3.7.3- Modélisation à l'aide du système ANNs couplé à un algorithme génétique (GA)

Dans les réseaux de neurones artificiels (ANNs), on distingue trois couches distinctes : la couche d'entrée, la ou les couches cachées, et la couche de sortie, chacune composée de nombreux neurones. La construction d'un modèle ANNs englobe différentes étapes : la phase d'apprentissage (qui comprend la propagation des données d'entrée à travers les couches multiples et la rétro-propagation de l'erreur), suivie de la phase de validation. Pour construire et entraîner un modèle de réseaux de neurones artificiels (ANNs) avec les données BBD mentionnées précédemment, nous pouvons utiliser soit l'algorithme de rétropropagation à propagation avant (BP), soit l'algorithme de Levenberg-Marquardt (`trainlm`). Cependant, comme suggéré par Maji *et al.* en 2014, nous avons étendu l'ensemble des données à 200 points générés à partir d'une équation polynomiale du deuxième ordre. Cette expansion était nécessaire car les données expérimentales du modèle BBD ne suffisent pas à elles seules à créer une architecture de réseau optimale. Le processus de validation permet de garantir la fiabilité du modèle développé au cours de la phase d'apprentissage. Le modèle est accessible pour des applications futures uniquement si les résultats de la validation concordent avec les résultats attendus.

À ce niveau, un réseau de neurones artificiels (ANN) multicouche standard à propagation avant des données d'entrée a été utilisé en conjonction avec un algorithme d'entraînement de modélisation ANN. Les ANNs multicouches, reconnus pour leur polyvalence dans l'approximation des processus physico-chimiques, sont couramment utilisés à cette fin, comme le notent Jasso-Salcedo *et al.*, 2017 ainsi que Moghri *et al.*, 2017. Généralement, les connexions du réseau sont exprimées à travers des biais et des poids. Outre la topologie du réseau, la sélection des paramètres internes est guidée par des données empiriques afin d'obtenir les meilleures performances possibles du modèle ANN. Pour déterminer les paramètres essentiels du ANN et le nombre optimal de neurones cachés, environ 11 algorithmes d'entraînement différents ont été utilisés en association avec une stratégie de validation croisée à cinq plis.

Les entrées du processus comprennent le pH (X_1), la concentration du substrat (X_2), la température (X_3) et le temps d'incubation (X_4), la sortie du système étant le rendement de l'activité antagoniste. Nous avons opté pour deux couches cachées, chacune avec un nombre de neurones variant de 1 à 10 (Tableau 6).

Tableau 6 Paramètres adoptés pour la création du modèle ANN.

Type	Description
Couche d'entrée	4 neurones (pH, concentration du substrat, température, temps d'incubation)
Couche cachée	N=2 couches ; m=12 neurones
Couche de sortie	1 neurone (rendement de l'activité antagoniste)
Taux d'apprentissage	0.01
Epoche	1000
MSE visée	0.001
Algorithmes	Levenberg-Marquardt (trainlm)
Fonction	Sigmoid (transig) : préféré entre les couches d'entrée et cachée Linéaire : préféré entre les couches cachées et de sortie

Les signaux émis par la couche cachée sont représentés en termes de poids et de seuils par une fonction de transfert (Eq. 3). De plus, les signaux transitant de la couche cachée à la couche de sortie constituent la valeur prédite, qui peut être exprimée par l'équation 4.

$$x_j = F\left(\sum_{i=1}^n x_i \times w_{ij} + P_j\right) \quad \text{Eq. 3}$$

$$y_{i-pred} = (F' \sum_{i=1}^n v_j \times x_j + Q) \quad \text{Eq. 4}$$

Dans ce contexte, x_i représente les valeurs d'entrée, tandis que P_j désigne les valeurs des neurones cachés. Pour éviter les débordements numériques causés par des poids excessivement grands ou excessivement petits, toutes les valeurs d'apprentissage et du modèle ANN ont été normalisées entre 0 et 1 en utilisant la méthode du min-max (éq. 5)

$$x_i = \frac{X_i - X_{min}}{X_{max} - X_{min}} \quad \text{Eq. 5}$$

x_i représente la valeur normalisée de X_i , tandis que X_{min} et X_{max} désignent les valeurs minimales et maximales de X dans son échelle d'origine.

Après l'apprentissage, l'algorithme de rétro-propagation subit des itérations de rétropropagation d'erreur pour réduire l'erreur quadratique moyenne (MSE) entre les données de sortie expérimentales et simulées, ajustant continuellement les poids et les biais entre les

neurones. Pour évaluer la précision des prédictions du modèle ANN par rapport aux cibles, des indices de performance tels que l'erreur quadratique moyenne (MSE) (éq.6) et le coefficient de détermination (R^2) (éq.7) ont été utilisés. Ces mesures ont été employées pour créer un modèle ANN optimal, comme le montrent les études de Sivapathasekaran *et al.* en 2010, Dhanarajan *et al.* en 2014 et Vasseghian et Dragoi en 2018. La détermination du nombre de neurones cachés a été guidée par l'étude de Rajendra *et al.* en 2009, en mettant l'accent sur la minimisation de MSE. Par la suite, une architecture de réseau optimale a été sélectionnée en prenant en compte les critères duals de minimisation de MSE et de maximisation des valeurs de R^2 . Ce choix a été fait pour atténuer le sur ajustement des données et améliorer la précision et la prédictibilité des sorties du modèle, comme indiqué dans les études de Huang *et al.* en 2007 et Dhanarajan *et al.* en 2014.

$$MSE = \sum_{i=1}^n \frac{(y_i - y_{i-pred})^2}{n} \quad \text{Eq. 6}$$

$$R^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (y_i - y_{i-pred})^2}{\sum_{i=0}^n (y_{i-av} - y_{i-pred})^2} \quad \text{Eq. 7}$$

Le calcul du poids du neurone caché (W_j) est fourni par l'équation (8) :

$$W_j = \sum_{i=1}^k w_{ij} x_i \quad \text{Eq. 8}$$

De même, le calcul du poids du neurone de sortie (W_k) est déterminé par l'équation (9) :

$$W_k = \sum_{j=1}^z w_{jk} x_j \quad \text{Eq. 9}$$

La sortie prédite est générée par la fonction d'activation, utilisant le poids du neurone dans la couche cachée ou de sortie, comme décrit dans l'équation (10) :

$$y = f(W + B) \quad \text{Eq. 10}$$

Pour évaluer l'influence des poids des connexions et l'impact relatif des facteurs d'entrée sur la sortie, une analyse de sensibilité a été réalisée en utilisant l'algorithme de Garson, tel qu'expliqué par Zhang et Pan en 2014. Cette analyse impliquait l'application de l'équation de Garson (Éq. 11) et l'exploration de diverses combinaisons potentielles de variables, comme détaillé dans les études d'Aleboye *et al.* en 2008 et de Yetilmezsoy et Demirel en 2008.

$$Q_{ik} = \frac{\sum_{j=1}^L (\frac{|w_{ij}|}{\sum_{i=0}^n |w_{rj}|} |v_{jk}|)}{\sum_{i=0}^N (\sum_{i=0}^n (\frac{|w_{ij}|}{\sum_{i=0}^n |w_{rj}|} |v_{jk}|))} \quad \text{Eq. 11}$$

Le processus d'optimisation impliquant l'algorithme génétique utilise une approche d'optimisation stochastique non linéaire pilotée par l'IA qui émule la sélection naturelle et les processus génétiques, comme décrit par Jiang *et al.* en 2014. Les algorithmes génétiques (GA) jouent un rôle essentiel pour éviter que les modèles ne restent coincés dans des optima locaux. Ils y parviennent en sélectionnant des poids et des seuils initiaux appropriés pour un modèle ANN préexistant, les utilisant comme composants d'une fonction de fitness.

L'algorithme génétique (GA) commence par générer une population initiale de solutions, en utilisant des paramètres tels que le pH opérationnel initial, la concentration en substrat, la température et le temps d'incubation comme entrées d'optimisation.

3.3.7.4- Validation expérimentales des modèles (BBD-RSM) et (ANNs-AG)

Deux expériences ont été réalisées sous agitation dans des erlenmeyer de 500 mL contenant 250 mL du milieu de culture (avoine comme seule source de carbone). Pour le premier essai, les facteurs sont les suivants : pH=3,4 – Concentration du substrat=7g/L – Température=37,43°C – Temps d'incubation=30h. Pour le second essai, les facteurs sont les suivants : pH=2,31 – Concentration du substrat=7g/L – Température=37.4 C° – Temps d'incubation=30h.

3.3.8- Application *in vivo* de la souche bactérienne sélectionnée comme agent de biocontrôle

3.3.8.1- Test de pathogénicité

Dans le but de mettre en évidence la phytopathogénécité des moisissures touchant la tomate en l'occurrence, *Fusarium* (F1) et *Alternaria* (Alt), deux tests ont été réalisés comme suit :

Tout d'abord, des solutions sporales des deux phytopathogènes ont été préparées en ajoutant une quantité de 20 mL d'eau physiologique stérile sur chaque boîte de Petri préalablementensemencées par *Fusarium* (F1) ou par *Alternaria* (Alt) pendant 10 jours sur le milieu PDA (Hariprasard et Niranjana, 2008). La surface de chaque culture chargée de conidies a ensuite été raclée stérilement à l'aide d'une pipette Pasteur. Les solutions sporales obtenues ont été vigoureusement agitées pendant une minute à l'aide d'un vortex et ajustées jusqu'à l'obtention d'une concentration de 5×10^6 spores/mL.

Pour le premier test, des plants de tomates de la variété *Louisa Royale* âgés de 4 à 5 semaines ont été plongés dans la solution sporale de *Fusarium* (F1) pendant 10 minutes. Le semis des plants de tomate a été effectué dans 4 pots de 3L contenant un mélange de sol et de terreau stérile. Ces derniers contiennent chacun 3 plantules. Le 4^{ème} pot représente le témoin, c'est-à-dire que les plants de tomate n'ont pas été traités par le phytopathogène.

Après 3 semaines d'incubation, la sévérité de la maladie provoquée par *fusarium* (F1) est notée comme suit ; 0 : plant saine ; 1 : léger flétrissement ; 2 : flétrissement unilatéral avec nécrose foliaires ; 3 : flétrissement généralisé ; 4 : mort du plant. L'indice de la maladie est calculé à partir de la formule suivante (Hibar *et al.*, 2007) :

$$I (\%) = \frac{\text{total des plants malades}}{\text{total des plants observés}} \times 100$$

Concernant le second test, d'autres plants de tomates sains ont été placés dans 4 pots à raison de 3 plants de tomates par pot, le 4^{ème} pot est considéré comme témoin. L'arrosage a été pratiqué chaque deux jours avec de l'eau du robinet jusqu'au stade requis pour l'inoculation (2 semaines après le semis), puis pulvérisée sur les parties aériennes de la plante en utilisant un pulvérisateur (Bahous *et al.*, 2008). Après 20 jours, les symptômes de la maladie ont été observés (Sallam *et al.*, 2012).

La sévérité de la maladie provoquée par *Alternaria* (Alt) est notée suivant les critères ci-dessous (Latha *et al.*, 2009):

0 = saine ; 1 : 1-5% ; 2 : 6-10% ; 3 : 11- 25 % ; 4 : 51-75% et 5 : > 76% de la surface foliaire infectée

Dans le but de nous assurer que les phytopathogènes sont responsables des symptômes apparus sur les plants de tomates, un ré-isolément a été effectué à partir de fragments de feuilles, de tiges et de racines de ces derniers sur milieu PDA.

3.3.8.2- Test d'antagonisme *in vivo* en conditions de pots

Il est à noter que la moisissure *Fusarium* (F1) a été sélectionnée dans cette étude comme agent phytopathogène compte tenu des dégâts aigus enregistrés sur la racine et les tiges des plantules. Dans le but d'étudier *in vivo* l'aptitude de la souche bactérienne sélectionnée à contrôler la maladie causée par le phytopathogène fongique *Fusarium* (F1), sur la tomate, la bactérie âgée de 18 à 24h a été inoculée sur les milieux liquides (LB) et (MA) dans des fioles de 500mL contenant 200 mL du milieu sous agitation à 180 rpm pendant 24h. Une solution sporale de l'isolat bactérien a été préparée (10^7 cellules/mL), en utilisant la cellule de

Malassez. Dans le même temps, une solution sporale du champignon phytopathogène *Fusarium* (F1) a été préparée (10^6 spores/mL).

Des racines de plants de tomates âgés de 4 semaines ont été plongées dans 10 mL de chaque suspension microbienne : 10 minutes dans la solution sporale de *Fusarium* (F1) puis 10 minutes dans la solution bactérienne. Trois plants de tomates ont été répliqués dans chaque pot. L'expérience a été réalisée en trois répétitions. Les plants de tomates ont été arrosés tous les deux jours avec de l'eau du robinet. Il est à noter que le témoin est uniquement traité par la suspension sporale de *F. napiforme*.

Après 20 jours d'incubation, la sévérité des symptômes selon cinq points (0-4), a été évaluée : 0 signifie plante saine, les indices 1, 2 et 3 correspondent aux degrés d'attaques légère, modérée et sévère respectivement symptômes de chlorose, de flétrissement et de rabougrissement des plants de tomate, et le degré 4 correspond aux plants morts (Cai *et al.*, 2003 ; Hibart *et al.*, 2007). La taille des plantes, le nombre de feuilles, le nombre de feuilles décolorées et la masse des racines ont été calculés. L'indice de la maladie est calculé à partir de la formule suivante (Hibar *et al.*, 2007) :

$$I (\%) = \frac{\text{total des plants malades}}{\text{total des plants observés}} \times 100$$

3.3.8.3- Test d'antagonisme *in vivo* en plein champ

Les essais sur le terrain ont été réalisés sur le champ expérimental de Chaab-arssas (Université Frères Mentouri – Constantine 1- Algérie), durant la période de juin à septembre 2021.

Le champ a été divisé en plusieurs parcelles, chacune ayant une superficie de 1m^2 séparées les unes des autres de 0,6m, du terreau a été ajouté à chaque parcelle et des puits sont formés (18 puits/parcelles) pour le repiquage des plants de tomates. Les racines des plants de tomates de la variété Louisa Royale âgés de 4 à 5 semaines, ont été plongées dans 10 mL de la suspension sporale de *Fusarium* (F1) pendant 10 minutes. Puis de nouveau plongées dans 10 mL de la suspension bactérienne préalablement inoculée séparément sur les milieux LB et MA.

Après 4, 8 et 12 semaines d'incubation, la sévérité des symptômes selon cinq points (0-4) a été évaluée telle que : 0 signifie plante saine ; les indices 1, 2 et 3 correspondent aux degrés d'attaques légère, modérée et sévère respectivement symptôme de chlorose, de flétrissement et de rabougrissement des plants de tomate, et le degré 4 correspond aux plants morts (Cai *et al.*, 2003 ; Hibart *et al.*, 2007). La taille des plantes, le nombre de feuilles, le nombre de feuilles décolorées, le nombre de fleurs, le nombre de fruits et la masse des racines, ont également été étudiés.

3.3.8.4- Etude statistique

L'étude statistique a été réalisée avec le logiciel *Minitab 18* développé par Minitab, Incorporated pour le système d'exploitation Windows uniquement. L'analyse de la variance ANOVA a été utilisée pour cette étude.

3.3.9- Évaluation de l'effet antagoniste de la bactérie sélectionnée vis-à-vis de *Fusarium* (F1) par microscopie à épifluorescence

Pour évaluer l'effet antagoniste de la bactérie sélectionnée vis-à-vis l'agent phytopatogène, une observation par microscopie à épifluorescence a été réalisée. Pour ce faire, des colonies de la souche bactérienne sélectionnées ont été inoculées sur le milieu LB et incubées à 30°C pendant 72h. Après cette période, la suspension de l'isolat bactérien a été calculée et ajustée à 10^7 cellules/mL. En parallèle, *Fusarium* (F1) a été inoculé sur milieu PDA et incubé pendant 7 jours à 30°C. Les solutions de spores du phytopathogène *Fusarium* (F1) ont été préparées en ajoutant une quantité de 20 mL d'eau physiologique stérile dans chaque boîte de Petri. La surface de chaque culture chargée de conidies a été grattée stérilement à l'aide d'une pipette Pasteur. Les solutions de spores obtenues ont été vigoureusement vortexées pendant une minute et ajustées à une concentration de 5×10^6 spores/mL (Hariprasard et Niranjana, 2008). 50 µL de la suspension bactérienne ont été inoculés de manière centrale, sur le milieu PDA, à l'aide d'une micropipette. Après adsorption de la goutte bactérienne, 50 µL de suspension de spores de l'agent phytopathogène ont été inoculés par-dessus l'inoculation précédente (Milet, 2017). Des boîtes de Petri inoculées séparément par les isolats bactériens et fongiques ont servi de témoins. L'observation microscopique à épifluorescence a été réalisée à l'aide d'un microscope Nikon Eclipse Ci.

3.3.10 - Extraction, séparation et analyse des lipopeptides par UPLC/MS

Afin de confirmer la production des lipopeptides y compris les surfactines par l'isolat bactérien sélectionné, une analyse par LC/MS a été réalisée comme suit ; la bactérie a été

cultivée dans des fioles de 250 mL sous agitation de 180 rpm dans deux milieux de cultures à savoir le milieu de culture à base d'avoine comme seule source de carbone et le milieu LB. Après fermentation les cultures ont été centrifugées à 15000 rpm pendant 20 minutes. Les surnageants ont été récupérés et passés à travers des micro-filtres de 0.20 µm. Les échantillons ont été chargés sur des cartouches d'extraction en phase solide C18 et les biosurfactant ont été désorbés avec de l'acétonitrile (ACN) à 100 %. Les échantillons résultants ont été analysés par UPLC en phase inverse couplée à un spectromètre de masse simple quad (UPLC MS (SQD) Waters acquity H class). La colonne utilisée est une colonne waters acquity UPLC BEH C18 1.7µm 2.1 x 50 mm avec protecteur de colonne. La phase mobile est composée d'eau (A) et d'acétonitrile (B), acidifiés avec 0,1% d'acide formique. Le débit est maintenu à 0,6 mL/min et la température de la colonne à 40°C, avec un gradient de 7 min : 70% – 30%, eau – ACN en temps initial et 5,20 min ; 5% – 95%, eau – ACN pour 2,43 et 5,10 min. Étant donné que la méthode dure 7 min, cela signifie que l'UPLC continue à conditionner la colonne de 5,2 à 7 avec un ratio (70% – 30% eau – ACN). Sur la base des temps de rétention des standards purifiés, les composés lipopeptidiques ont été déterminés puis chaque lipopeptide a été identifié, en référence à un SQD (Single Quadrupole mass Detection). Il convient de noter que la température est égale à 130°C ; la température de désolvatation (400 °C) ; le débit d'azote est de 1000 l/h pour la désolvatation et la tension du cône est égale à 50 V.

3.3.11- Activité PGPR *in vitro*

Nous nous sommes également intéressés à la recherche de molécules à effet PGPR, notamment : la fixation d'azote, la production de l'amylase, de protéase, de cellulase, du cyanure d'hydrogène, de l'acide indole acétique et des sidérophores.

3.3.11.1- Fixation d'azote

La croissance de la souche sur un milieu sans azote est vérifiée par sa capacité à se développer sur le milieu Winogradsky Salt (WS) (Annexe 1) (Cherif-Silini *et al.*, 2019).

3.3.11.2- Production d'amylase

La capacité de la production d'amylase a été évaluée par inoculation de la souche bactérienne sélectionnée sur des milieux gélosés nutritifs additionnés à 1 % d'amidon soluble. Après 2 jours d'incubation, les colonies ont été inondées d'une solution de Lugol. L'hydrolyse de l'amidon est observée par l'apparition d'une zone claire autour de la colonie, à l'inverse, les zones contenant de l'amidon sont colorées en brun (Prescot *et al.*, 2003).

3.3.11.3- Production de protéase

L'isolat bactérien sélectionné a été inoculé sur des milieux gélosés au lait écrémé, puis incubé à 30 °C pendant 2 jours. L'activité de la protéase a été enregistrée par le développement d'une zone claire autour des colonies, indiquant que les protéines ont été hydrolysées par les bactéries (De Vos *et al.*, 2009).

3.3.11.4- Production du HCN

La production de l'acide cyanogène a été mise en évidence selon le protocole de Lorck (1948) avec quelques modifications. La technique consiste à additionner 4 g de glycine stérilisée séparément dans le milieu LB, puis,ensemencé par une culture bactérienne âgée de 18 à 24h. Ensuite, un disque du papier wattman (9 mm) stérile a été déposé sur la face interne du couvercle de la boîte puis imbibé d'une solution d'acide picrique (0,5%) et de carbonate de sodium (2%). Le test est considéré positif quand il y a un virage de couleur du jaune au marron.

3.3.11.5- Production de NH₃

La production d'ammoniaque a été estimée selon le protocole proposé par Cappuccino et Sherman (1992). 100 µL de l'isolat bactérien sélectionné a été inoculé sur de l'eau peptonée ensuite incubé à 30°C pendant 2 jours. L'apparition d'une couleur jaunâtre à brunâtre après l'ajout de 0,5 mL du réactif de Nessler indique la production de NH₃.

3.3.11.6- Production d'Acide Indole Acétique (AIA)

La production d'AIA a été testée en utilisant la procédure décrite par Penrose et Glick.(2003). Le bouillon LB additionné à 1 g/L de tryptophane a été inoculé par 100 µL de la souche bactérienne et incubé à 30°C pendant 2 jours. La culture bactérienne obtenue a été centrifugée à 3000 tr/min pendant 20 min. Ensuite, 2 mL du surnageant ont été mélangés avec 4 mL du réactif de Salkowski (50 mL, 35 % d'acide perchlorique, et 1 mL de solution de FeCl₃ à 0,5 M) (Annexe 1).

3.3.11.7- Production des sidérophores

La production de sidérophores a été réalisée suivant le protocole de Schwyn et Neilands (1987) avec quelques modifications. Une culture bactérienne âgée de 18 à 24h a été ensemencée sur le milieu King B solide (Annexe 1) et incubée à 30°C pendant 48h. Après croissance de la souche bactérienne, 500 µl de la solution de Chrome Azurol S (CAS)

(Annexe 1) a été déposée sur la culture bactérienne. Un changement de couleur du bleu à l'orange, apparaissant autour des colonies, indique la production des sidérophores.

3.3.3.11.8- Production de biosurfactant

La production de biosurfactant par la souche bactérienne sélectionnée a été effectuée préalablement, *in vitro*, en se basant sur l'activité hémolytique selon la méthode décrite par Carrillo *et al.* (1996). En effet, la bactérie sélectionnée a étéensemencée sur le milieu gélose au sang à 5 % et incubée à 30°C pendant 48h. Les zones claires autour des colonies confirment la production de biosurfactants.

Résultats

4- Résultats

Cette recherche est focalisée sur la mise en valeur des matériaux ligno-cellulosiques afin d'obtenir et produire des microorganismes dotés de propriétés de biocontrôle, visant leur application en Agriculture. En adoptant une stratégie qui favorise la réutilisation des déchets de biomasse et la production de bio-agents, cette démarche présente un double avantage, elle convertit efficacement les déchets en ressources utiles, tout en offrant des alternatives naturelles pour le renforcement des cultures. Ce processus souligne le potentiel des approches innovantes dans la gestion des ressources de la biomasse et le perfectionnement des méthodes de bio-contrôle agricole.

4.1- Isolement des microorganismes à partir d'échantillon riche en matière ligno-cellulosique

Soixante-douze isolats microbiens ont été obtenus à partir des différents échantillons utilisés (Tableau 7). En effet, parmi les isolats obtenus 43 sont des bactéries et 29 représentent des moisissures. L'échantillon prélevé du sol de l'arbre de pin a révélé la présence de 24 isolats bactériens et 10 isolats fongiques. Les prélèvements effectués à partir du bois de l'arbre de pin ont montré la présence de 11 isolats bactériens et 6 isolats fongiques. Enfin, l'isolement provenant des coques de noix et d'amandes ont montré la présence de 8 isolats bactériens et 13 isolats fongiques. Ces résultats montrent que les échantillons utilisés sont plus riches en bactéries qu'en mycètes d'une part et que les bactéries sont plus présentes dans le sol en comparaison à d'autres échantillon, d'autre part.

Tableau 7 Isolats obtenus à partir de différents échantillons.

Echantillons	Microorganismes isolés	
	Bactéries	Moisissures
Sol autour de l'arbre de pin	24	10
Bois de l'arbre de pin	11	6
Coques des noix et des amandes	8	13
Totaux	43	29

4.2- Sélection des microorganismes dégradant la matière ligno-cellulosique

Les résultats de la sélection des microorganismes capables de dégrader la matière ligno-cellulosique, sur des milieux à base de cellulose, de xylane et de lignine après 5 jours d'incubation à 30°C, ont montré que 6 isolats bactériens (P2Sni, P2SNj, P2SNb, P2Sne, M4, M1S) et 2 moisissures (P.L et P2L) ont présenté un résultat positif (tableau 8). Cependant, seulement une bactérie (M4) et une moisissure (P2L) ont développé une activité enzymatique intéressante en montrant la dégradation de tous les constituants de la biomasse ligno-cellulosique (cellulose, hémicellulose et lignine). Ce résultat est exprimé par l'apparition de zones claires autour des colonies avec des indices enzymatiques égaux à 1,52 et 1,62 pour l'isolat bactérien (M4) sur milieu cellulose et hémicellulose respectivement, et 1,42 et 1,19 pour l'isolat fongique (P2L) sur les milieux cellulose et hémicellulose respectivement. Par ailleurs, la dégradation de la lignine s'est manifestée par un changement de couleur du vert au rouge brunâtre confirmant la dégradation de composés phénoliques de la lignine (Tableau 8, figure 10 et 11).

Tableau 8 Isolats dégradant la biomasse ligno-cellulosique.

Code de la souche	Cellulase (I.E.)	Xylanase (I.E.)	Laccase
P.L	1,04	-**	-
P₂Sni	1,25	-	-
P2SNj	1,33	-	-
P2SNb	1,50	-	-
P2Sne	1,09	-	-
M4	1,52	1,62	+*
M1S	1,11	1,05	-
P2L	1,42	1,19	+

I.E. : indice enzymatique, * Résultat positif, ** Résultat négatif

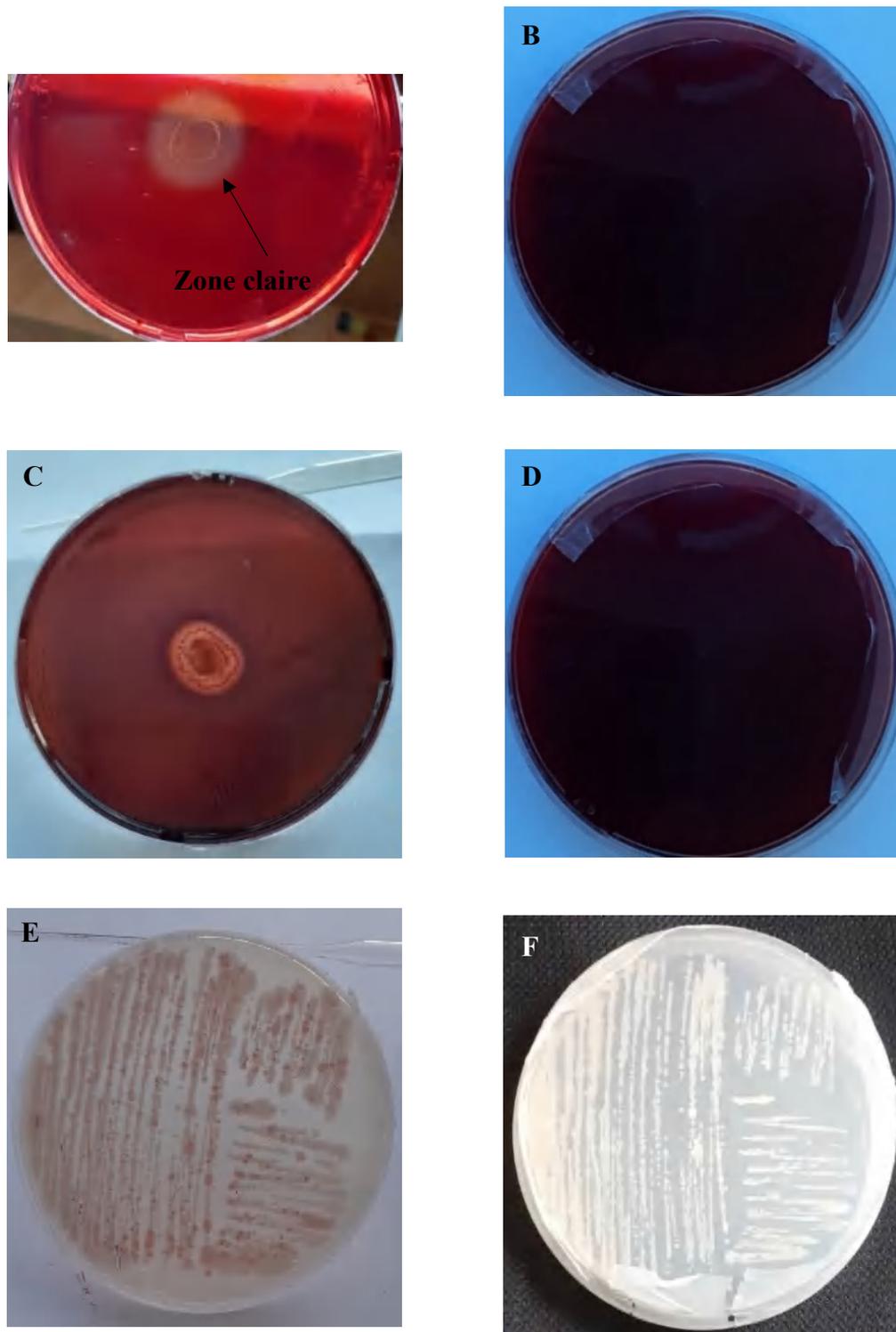


Figure 10 Dégradation de la matière ligno-cellulosique par l'isolat bactérien (M4): A, cellulase ; C, hémicellulase ; E, laccase ; B, D et F, témoins.

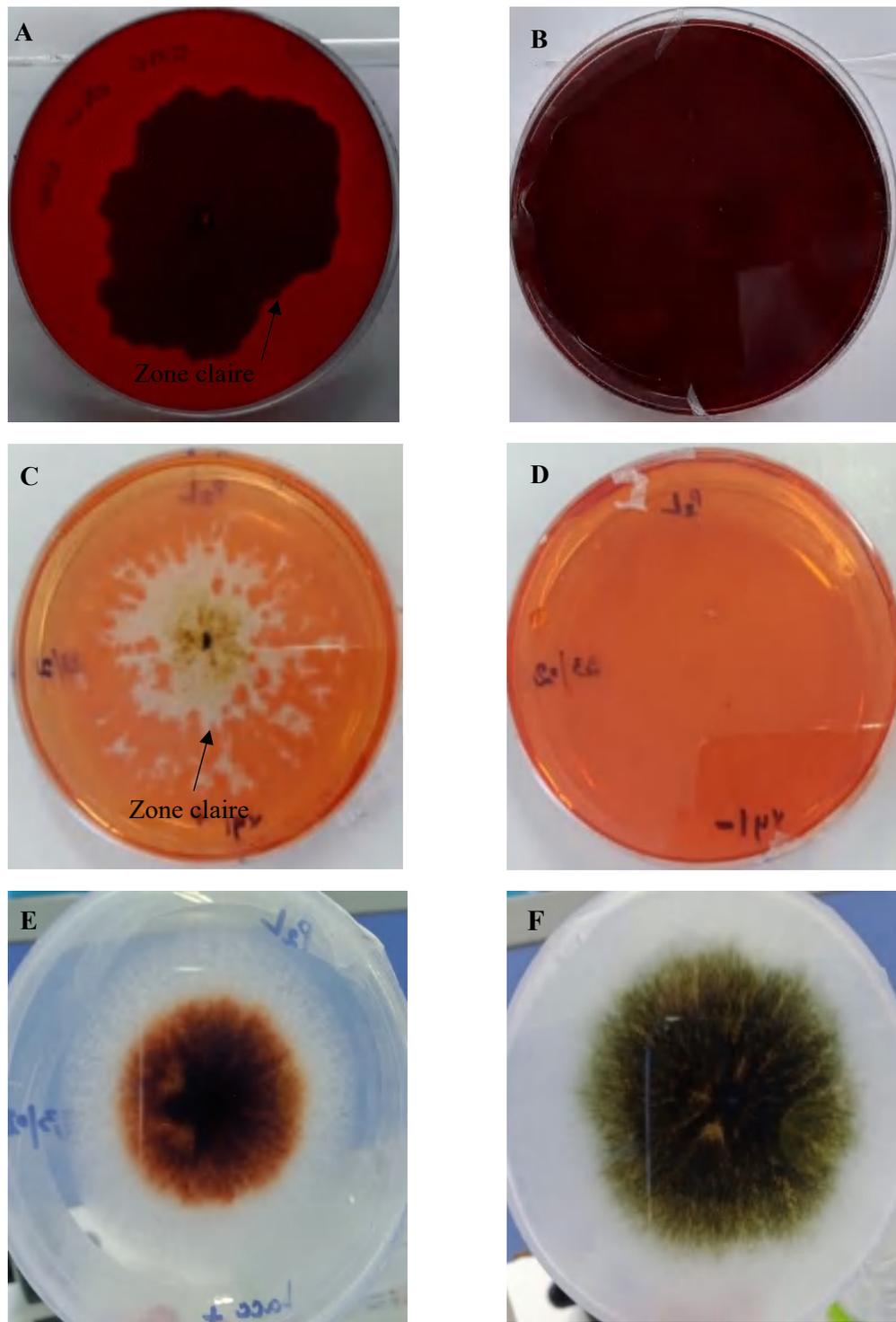


Figure 11 Dégradation de la matière ligno-cellulosique par l'isolat fongique (P2L): A, cellulase ; C, hémicellulase ; E, laccase ; B, D et F, témoins.

4.3- Sélection des microorganismes développant des potentialités de biocontrôle

4.3.1- Isolement et identification des agents pathogènes infectant la tomate

Les isolats phytopathogènes infectant la tomate, notamment l'isolat (Alt) provenant de tomates infectées et l'isolat fongique (F1) fourni par le laboratoire de Mycologie, Biotechnologie et Activité Microbienne, ont été identifiés comme suit :

4.3.1.1- Examen macroscopique

L'observation macroscopique de l'isolat (Alt), après 7 jours de croissance sur gélose, a mis en évidence les caractéristiques suivantes : une colonie de teinte claire, tirant vers l'olivâtre verdâtre, présentant une texture duveteuse, avec une face inférieure de couleur grise, et enfin des bordures mycéliennes régulières (Figure 12 A et B). L'examen macroscopique de l'isolat (F1) à 30°C sur milieu gélosé, a révélé des colonies plates avec une croissance rapide. La texture des colonies est cotonneuse. Le revers des colonies est de couleur rose à saumon et les bordures des colonies sont régulières (Figure 13 A et B).

4.3.1.2- Examen microscopique

L'observation microscopique du phytopathogène (Alt) sous microscope optique (X40) a révélé la présence d'hyphes septés de couleur brune, de spores allongées, de conidies en chaînes sur des conidiophores. Ces caractéristiques microscopiques permettent d'identifier et de caractériser ce champignon communément rencontré dans divers environnements (Figure 12 C). L'examen microscopique de l'isolat (F1) a été effectué à l'aide d'un microscope à fluorescence au grossissement (X60), cet examen a révélé la présence d'hyphes septés. Ces hyphes peuvent être observés sous forme de filaments ramifiés qui forment un réseau appelé mycélium formé de conidiophores, qui sont responsables de la formation et de la dispersion des spores et de chlamydospores, qui sont des structures de survie épaissies et résistantes. Ces chlamydospores peuvent être observés comme des structures rondes ou ovales plus épaisses que les conidies (Figure 13 C et D).

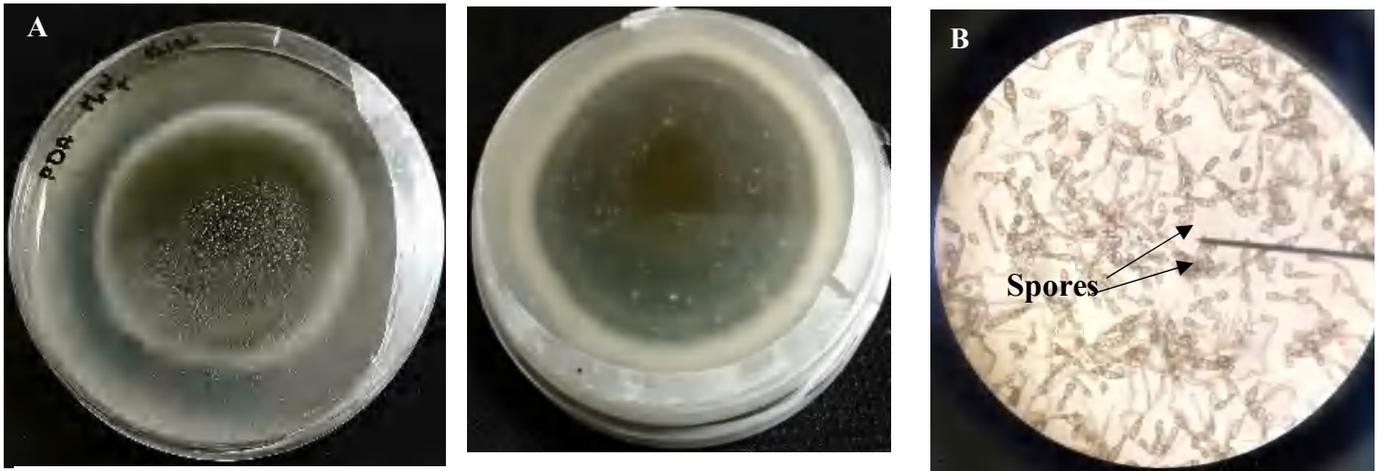


Figure 12 Aspect morphologique de l'isolat (Alt) : **A**, observation macroscopique ; **B**, aspect microscopique (microscope optique X40).

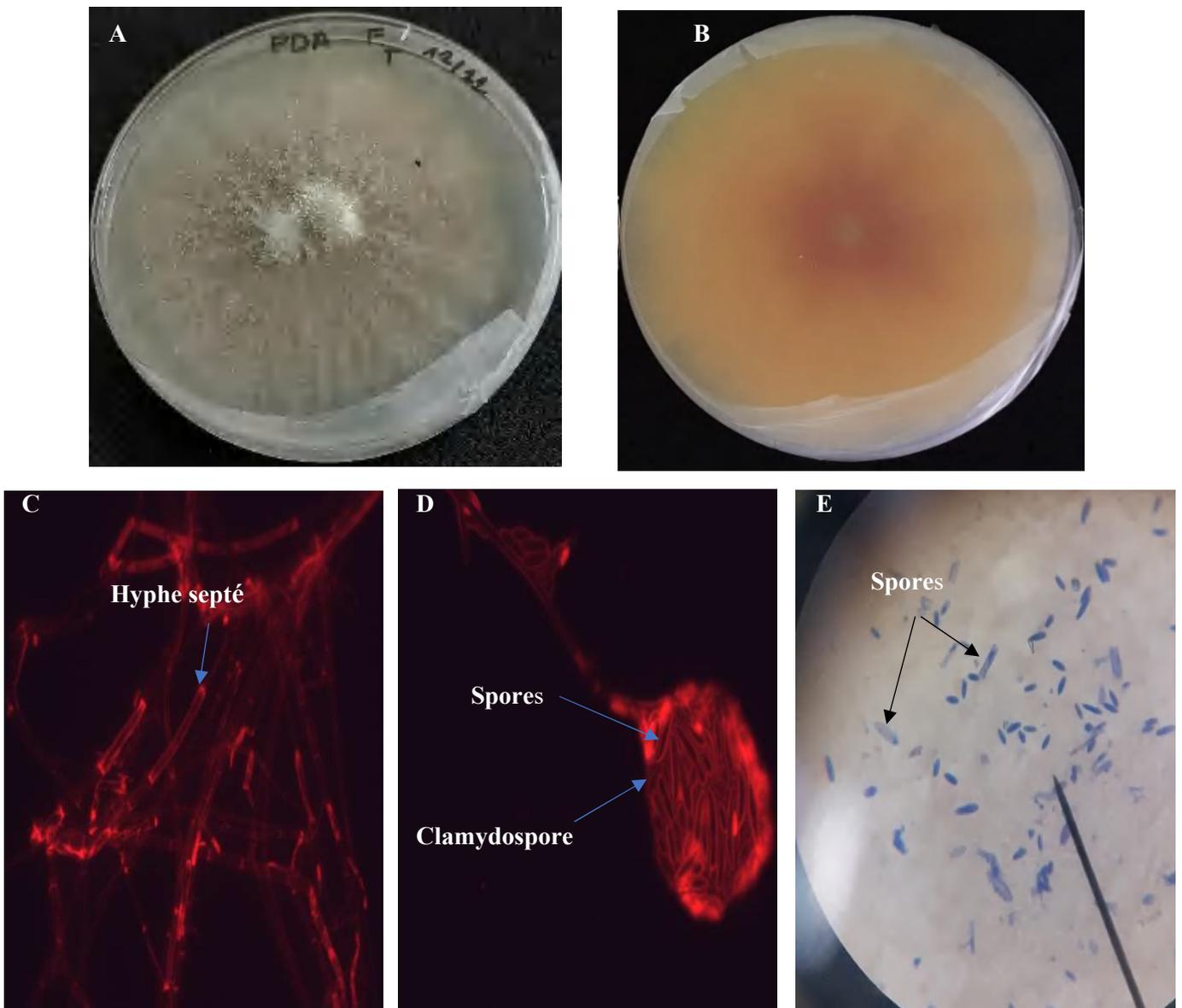


Figure 13 Aspect morphologique de l'isolat (F1) : **A** et **B** Aspect macroscopique ; **C** et **D**, Aspect microscopique sous microscope à fluorescence X60 ; **E**, Aspect microscopique sous microscope optique (X40).

4.3.1.3- Identification moléculaire

L'identification moléculaire par les séquences des gènes *ITS rDNA*, de *Alternaria sp* et *Fusarium sp*. après avoir été corrigées puis comparées aux séquences précédemment publiées dans GenBank, étaient similaires à 99% à celles de *Fusarium napiforme* (ON204349) et *Alternaria alternata* (ON714501). Les séquences des gènes *ITS* des deux souches sont illustrées sur le tableau 9.

Tableau 9 Séquences *ITS rDNA* (*A. alternata* et *F. napiforme*).

Souche	Séquence du gène <i>ITS</i>
<i>Alternaria alternata</i>	GTTGTGCCCA CCCGGTGCTT TCTCTGAGCG CGTAGCCAAA GCCTGGCTTA TCGCGATGAG GGGCATTITTT GGGTGGTGGG GATGTGCGAA CTTTTACGCG CTAGCGCTAG TCCGCATGCG GCCTTCGCGA ACTCCAACGC AATGACGCAC ATGTAATTTT CCCATTCTGG CCACAGCGAG CTAACAAGCC TCACAGGAAG CCGCCGAACT CGGTAAGGGT TCCTTCAAGT ACGCATGGGT CCTCGACAAG TTGAAGGCCG AGCGTGAGCG TGGTATCACC ATCGACATTG CTCTCTGGAA GTTCGAGACT CCCAAGGTTA GTACCCCTCT GCCTACTACA TCAAGCTCTA TACAATGCTA ACATGCTGTA CTCAGTACTA TGTCACCGTC ATTGACGCCC CCGGTCACCG TGATTTTCATC AAGAACATGA TC
<i>Fusarium napiforme</i>	AAAATTCTTT GGTCTCCATT AGAGGAAGTA AAAGTCGTAA CAAGGTCTCC GTTGGTGAAC CAGCGGAGGG ATCATTACCG AGTTTACAAC TCCCAAACCC CTGTGAACAT ACCAATTGTT GCCTCGGCGG ATCAGCCCGC TCCCGGTAAA ACGGGACGGC CCGCCAGAGG ACCCCTAAAC TCTGTTTTCTA TATGTAACCT CTGAGTAAAA CCATAAATAA ATCAAAACTT TCAACAACGG ATCTCTTGGT TCTGGCATCG ATGAAGAACG CAGCAAAATG CGATAAGTAA TGTGAATTGC AGAAATTCAGT GAATCATCGA ATCTTTGAAC GCACATTGCG CCCGCCAGTA TTCTGGCGGG CATGCCGTGT CGAGCGTCAT TTCAACCCTC AAGCCCAGCT TGGTGTGGG ACTCGCGAGT CAAATCGCGT TCCCCAAATT GATTGGCGGT CACGTCGAGC TTCCATAGCG TAGTAGTAAA ACCCTCGTTA CTGGTAATCG TCGCGGCCAC GCCGTTAAAC CCCAACTTCT GAATGTTGAC CTCGGATCAG GTAGGAACCC ATTT

4.4- Sélection des isolats antagonistes : Test d'antagonisme *in vitro*

Les résultats obtenus lors de l'étude de l'activité antifongique, ont montré que la croissance mycélienne du phytopathogène en absence de la souche bactérienne antagoniste, est plus importante qu'en présence de l'antagoniste. En effet, les taux d'inhibition de la croissance des phytopathogènes *Fusarium napiforme* (ON204349) et *Alternaria alternata* (ON714501) par l'isolat bactérien (M4) sont de 72% et de 64% respectivement (Figures 14). Par ailleurs, l'activité antifongique de (P2L) a montré un taux d'inhibition de 35,4% et de 52,3 % vis-à-vis les souches fongiques *F. napiforme* et *A. alternata* respectivement (Figures 15).

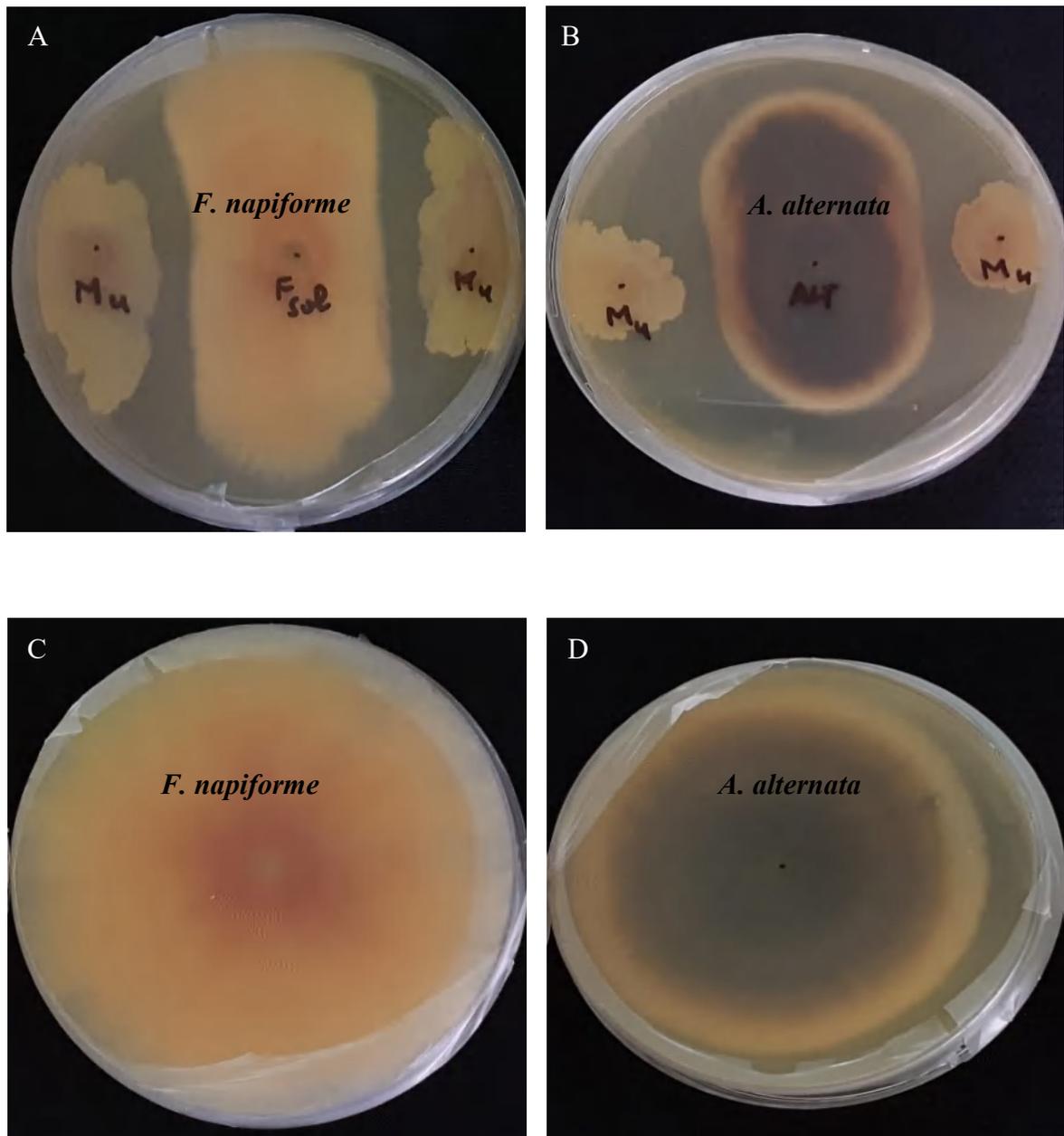


Figure 14 Activité antifongique de la souche bactérienne M4 par la technique de confrontation directe vis-à-vis des phytopathogènes : **A**, *F. napiforme* ; **B**, *A. alternata* (**C** et **D**, témoins).

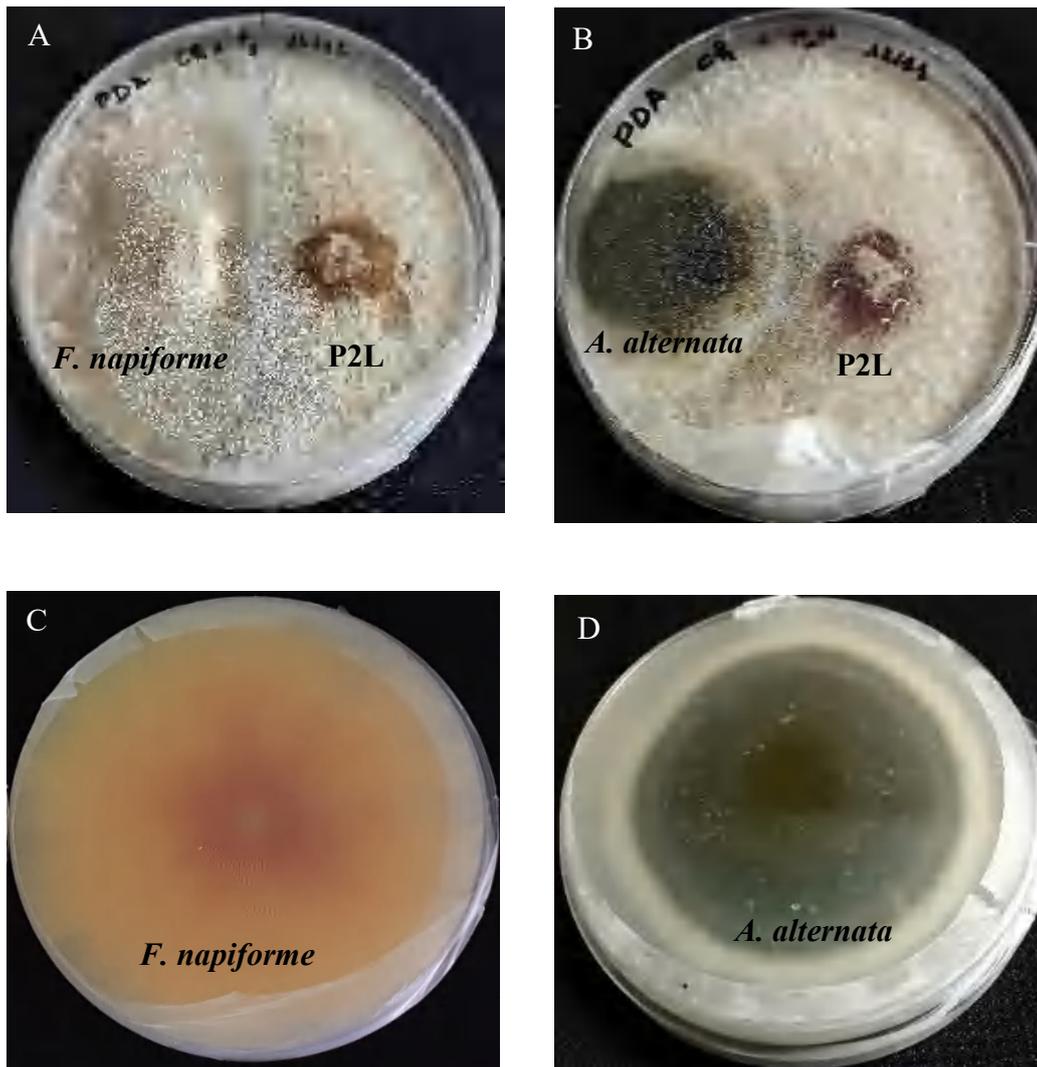


Figure 15 Activité antifongique de l'isolat fongique (P2L) par la technique de confrontation directe vis-à-vis des phytopathogènes : **A**, *F. napiforme* ; **B**, *A. alternata*. (**C** et **D**, témoins).

4.5- Identifications des isolats antagonistes sélectionnés (M4) et (P2L)

4.5.1- Identification morphologique de l'isolat (M4)

L'examen macroscopique a montré que les colonies de la souche bactérienne (M4), cultivées sur milieu LB à 30°C pendant 24h, sont de couleurs blanchâtres, de forme ronde et de diamètres variant entre 1 et 2 mm (Figure 16 A). De plus, l'observation à l'état frais et la coloration de Gram ont permis de donner une idée sur la morphologie des cellules bactériennes, sur leur mobilité et sur la composition de leurs parois. En effet, les résultats obtenus de l'examen microscopique ont montré que les cellules sont mobiles, de type bacille, de taille moyenne (Figure 16B). Le test de la catalase a montré que (M4) est catalase positive, car elle présente des bulles après le dépôt du peroxyde d'hydrogène H₂O₂. Cette enzyme

RESULTATS

contient du fer qui catalyse la décomposition du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Le test de sporulation effectué sur des cultures submergées sur milieu LB, a révélé que l'isolat sélectionné a développé des spores. Cette constatation est confirmée par le test de traitement thermique. En effet, l'ensemencement d'une suspension bactérienne chauffée à $80^\circ C$ pendant 12min, sur gélose nutritive a abouti à un développement de colonies caractéristiques (Figure 16 D).

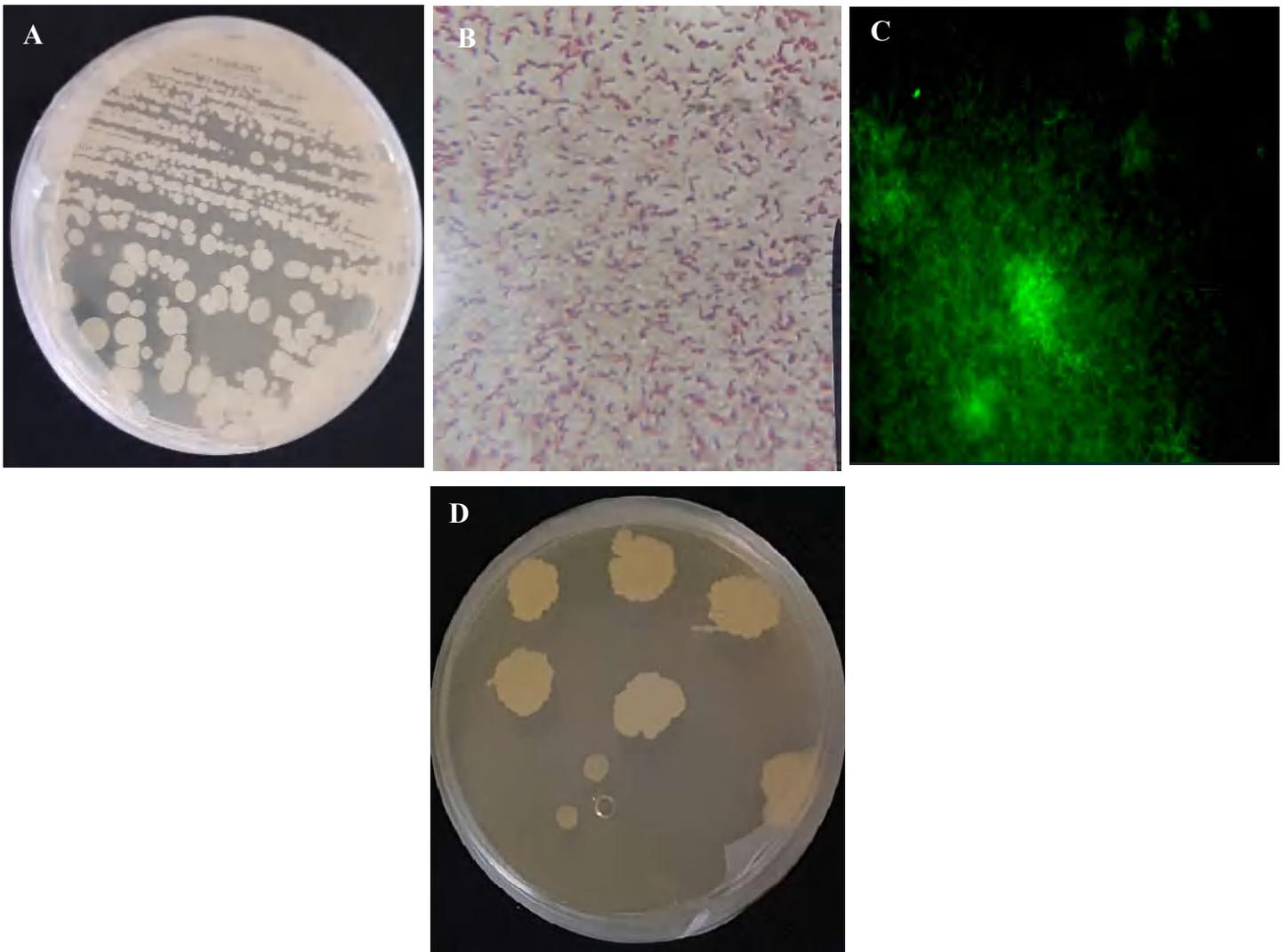


Figure 16 Etude morphologique de l'isolat (M4) : **A**, aspect macroscopique ; **B**, Aspect microscopique sous microscope optique (X40) ; **C**, Aspect microscopique sous microscope à fluorescence (X60) ; **D**, test de sporulation.

L'identification préliminaire de la souche bactérienne (M4) à savoir, des observations macroscopique et microscopique ainsi que le test catalase, a montré que cette dernière

appartient au groupe de bactérie Gram+. Le test de sporulation a confirmé que la souche bactérienne appartient au genre *Bacillus*.

4.5.2- Identification morphologique de l'isolat (P2L)

L'aspect macroscopique de l'isolat (P2L) sur milieu Sabouraud a révélé un développement rapide et de manière étendue, atteignant un diamètre de 42 mm après 48 heures d'incubation. Sa surface est caractérisée par une texture laineuse et blanche qui vire au vert olive à partir du troisième jour. Le revers de la colonie présente une gamme de couleurs allant du jaune pâle à l'olivâtre, avec une teinte brun-noir observée (Figure 17 A et B). Les observations microscopiques sous microscope optique (X40), a montré que le thalle est composé d'hyphes septés. Cependant, leur séparation est difficile en raison de la structure dense caractéristique de ce type de champignons. En ce qui concerne la sporogenèse, les ascospores se présentent sous forme unicellulaire et elliptique (Figure 17 C et D)

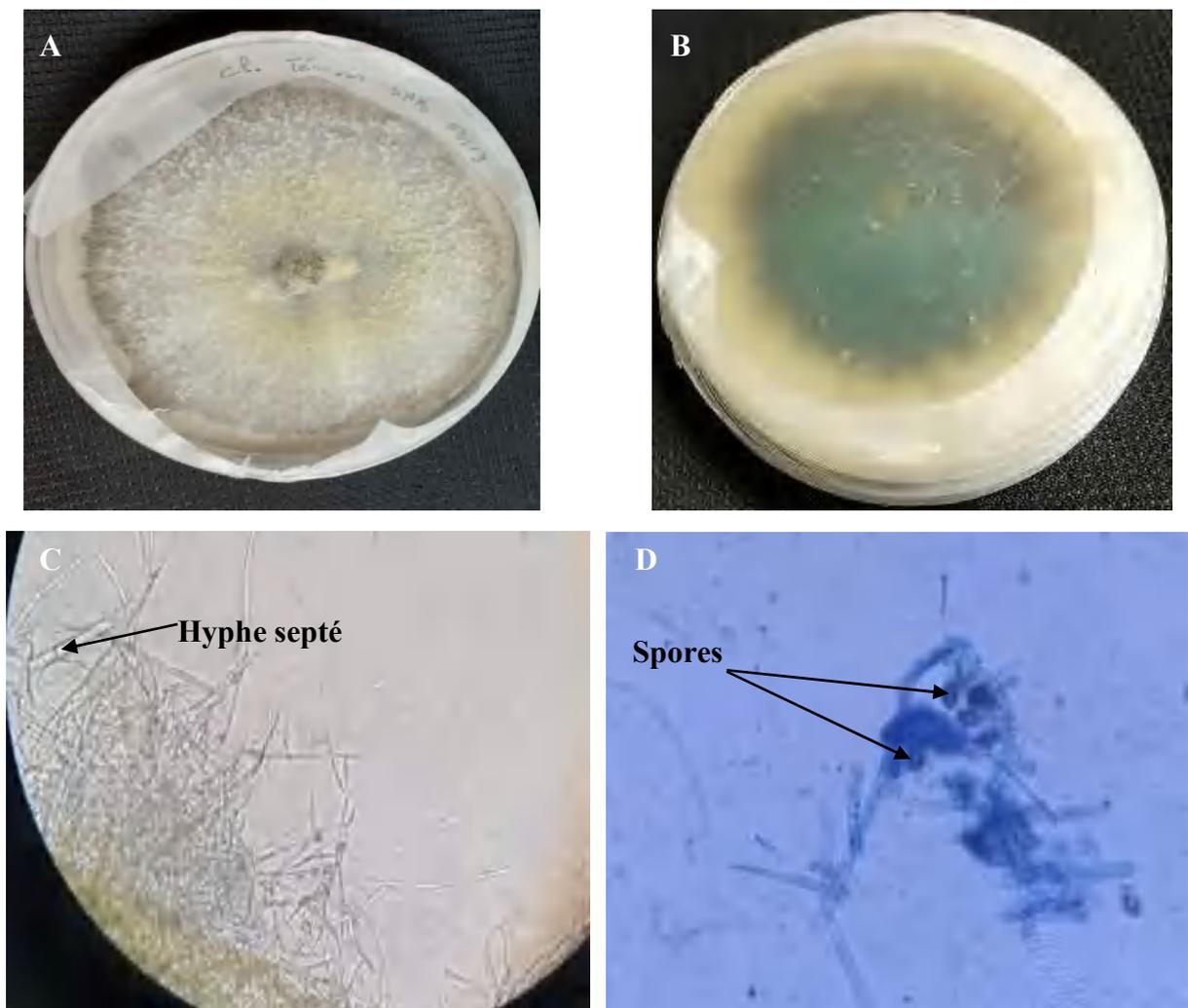


Figure 17 Aspect morphologique de l'isolat (P2L) : **A** et **B**, observation macroscopique ; **C** et **D**, aspect microscopique (microscope optique X40).

4.5.3- Identification moléculaire des isolats sélectionnés

Ce test a pour objectif de se prononcer définitivement quant à l'identification des isolats sélectionnés. L'identification par la séquence *ADNr 16S* de l'opéron ribosomal nucléaire de l'isolat bactérien (M4) après avoir été comparée aux séquences d'*ADNr 16S* de la base de données GenBank a montré une similarité de 99% au genre *Bacillus halotolerans* (ON204239). Sa séquence d'ADN est donnée dans le tableau 10. Tandis que l'identification par les séquences des gènes *ITS rDNA* de l'isolat fongique (P2L) après avoir été corrigées puis comparées aux séquences précédemment publiées dans GenBank, étaient similaires à 99% à celles de *Chaetomium strumarum* (Annexe 3).

Tableau 10 Séquence du gène ribosomal *RNA-16S*.

Souche	Séquence du gène <i>RNA-16S</i>			
<i>Bacillus halotolerans</i>	ATGGACGAAA	GTCTGACGGA	GCAACGCCGC	GTGAGTGATG
	AAGGTTTTTCG	GATCGTAAAG	CTCTGTTGTT	AGGGAAGAAC
	AAGTACCGTT	CGAATAGGGC	GGTACCTTGA	CGGTACCTAA
	CCAGAAAGCC	ACGGCTAACT	ACGTGCCAGC	AGCCGCGGTA
	ATACGTAGGT	GGCAAGCGTT	GTCCGGAATT	ATTGGGCGTA
	AAGGGCTCGC	AGGCGGTTCC	TTAAGTCTGA	TGTGAAAGCC
	CCCGGCTCAA	CCGGGGAGGG	TCATTGGAAA	CTGGGGAAct
	TGAGTGCAGA	AGAGGAGAGT		
	GGAATTCCAC	GTGTAGCGGT	GAAATGCGTA	GAGATGTGGA
	GGAACACCAG	TGGCGAAGGC	GACTCTCTGG	TCTGTAActG
	ACGCTGAGGA	GCGAAAGCGT	GGGGAGCGAA	CAGGATTAGA
	TACCCTGGTA	GTCCACGCCG	TAAACGATGA	GTGCTAAGTG
	TTAGGGGGTT	TCCGCCCTT	AGTGCTGCAG	CTAACGCATT
	AAGCACTCCG	CCTGGGGAGT	ACGGTCGCAA	GACTGAAAct
	CAAAGGAATT	GACGGGGGCC	CGCACAAGCG	GTGGAGCATG
	TGGTTTAATT	CGAAGCAACG		
	CGAAGAACCT	TACCAGGTCT	TGACATCCTC	TGACAATCCT
	AGAGATAGGA	CGTCCCCTTC	GGGGGCAGAG	TGACAGGTGG
	TGCATGGTTG	TCGTCAGCTC	GTGTCGTGAG	ATGTTGGGTT
	AAGTCCCGCA	ACGAGCGCAA	CCCTTGATCT	TAGTTGCCAG
	CATTCAGTTG	GGCACTCTAA	GGTGACTGCC	GGTGACAAAC
	CGGAGGAAGG	TGGGGATGAC	GTCAAATCAT	CATGCCCTT
	ATGACCTGGG	CTACACACGT	GCTACAATGG	ACAGAACAAA
	GGGCAGCGAA	ACCGCGAGGT		
	TAAGCCAATC	CCACAAATCT	GTTCTCAGTT	CGGATCGCAG
	TCTGCAACTC	GACTGCGTGA	AGCTGGAATC	GCTAGTAATC
	GCGGATCAGC	ATGCCGCGGT	GAATACGTTT	CCGGGCCTTG
	TACACACCGC	CCGTCACACC	ACGAGAGTTT	GTAACACCCG
	AAGTCGGTGA	GGTAACCTTT	ATGGAGCCAG	CCGCCGAAGG
	TGGACAGTGG	TT		

(ON204239), isolée à partir du sol autour de l'arbre de pin et la souche fongique (P2L)

obtenue à partir des coques de noix ayant un résultat positif concernant la dégradation de la matière ligno-cellulosique d'une part et à inhiber potentiellement la croissance des souches de moisissures phytopathogènes de la tomate d'autre part, ont été préalablement sélectionnés pour la suite du travail. Néanmoins, la souche fongique (P2L) identifiée par voie moléculaire comme *C. strumarum* a été ignorée pour la suite de cette étude, en raison de sa pathogénicité vis-à-vis de l'Homme.

4.6- Étude de la bactérie *B. halotolerans* isolée du sol autour de l'arbre de pin

4.6.1-Eude pédologique du sol

Les résultats de l'étude pédologique du sol autour de l'arbre de pin (Forêt El Baraouia), sont résumés dans le tableau 11.

Tableau 11 Analyse du sol.

Paramètres	Valeurs	Unités
pH	8,17	
Conductivité électrique (CE)	1,6	(ms/cm)
Saturation	50	%
CO_3H^-	97,60	mg/L
SO_4^{--}	255,84	mg/L
Cl^-	189,21	mg/L
Ca^{++}	144,60	mg/L
Mg^{++}	22,80	mg/L
Na^+	52,44	mg/L
K^+	3,19	mg/L

Etude réalisée au Laboratoire de Chimie des Sols, Hydraulique, zone Palma, Constantine

Les résultats obtenus ont montré que le sol d'El Baaraouia est caractérisé par un pH légèrement alcalin de 8,17 et une conductivité électrique de 1,6 mS/cm, suggérant une salinité relativement élevée. La saturation de 50 % a indiqué une teneur en humidité modérée. La présence d'ions carbonate (97,60 mg/L), sulfate (255,84 mg/L), chlorure (189,21 mg/L), calcium (144,60 mg/L), et magnésium (22,80 mg/L) a montré des valeurs élevées, ce qui peut influencer la fertilité du sol. Les concentrations en ions sodium (52,44 mg/L) et potassium (3,19 mg/L) ont suggéré des niveaux modérés à faibles, ce qui montre la pauvreté de ces éléments nutritifs dans le sol. Ces résultats ont montré que la région d'échantillonnage a, généralement, présenté une certaine adaptation à des conditions environnementales

spécifiques relativement aux sols fertiles, et peut être considérée comme un milieu partiellement inhabituel.

4.6.2-Etude climatologique de site de prélèvement

La forêt d'El Baaraouia, localisée dans la région de l'Est de Constantine en Algérie, est soumise à un climat caractérisé par des étés chauds et secs et des hivers doux et pluvieux. Les températures estivales peuvent souvent dépasser les 30°C, tandis que les températures hivernales restent généralement douces, rarement en dessous de 0°C. Les précipitations annuelles, bien que modérées, sont souvent concentrées pendant les mois d'automne et d'hiver, avec des sécheresses prolongées pendant les mois d'été. L'ensoleillement abondant et les vents dominants, souvent de l'ouest et du nord-ouest, contribuent également au caractère spécifique du climat de cette région. Ces conditions climatiques particulières, avec des températures estivales élevées, des précipitations saisonnières concentrées et des sécheresses estivales prolongées, peuvent créer un environnement écologique relativement extrême dans la région d'El Baaraouia. Cela peut influencer divers aspects de la vie végétale et animale, ainsi que les processus écologiques dans la forêt, et justifierait la qualification de la région comme partiellement extrême.

4.6.3- Caractérisation de *B. halotolerans*

4.6.3.1- Courbe de croissance de *B. halotolerans*

La courbe de croissance de *B. halotolerans* est illustrée par la figure 18. Une courte phase de latence a été observée, ce qui signifie que *B. halotolerans* s'adapte très vite au milieu de culture, suivie d'une accélération rapide, indiquant une multiplication cellulaire rapide, après 10h, la croissance a ralenti et a atteint un plateau, indiquant une phase stationnaire où la croissance et la mort cellulaires se compensent, généralement à mesure que les ressources deviennent limitantes ou que les déchets s'accumulent. Enfin, après 40h, une phase de déclin a été observée où la densité cellulaire diminue car les conditions deviennent extrêmement défavorables.

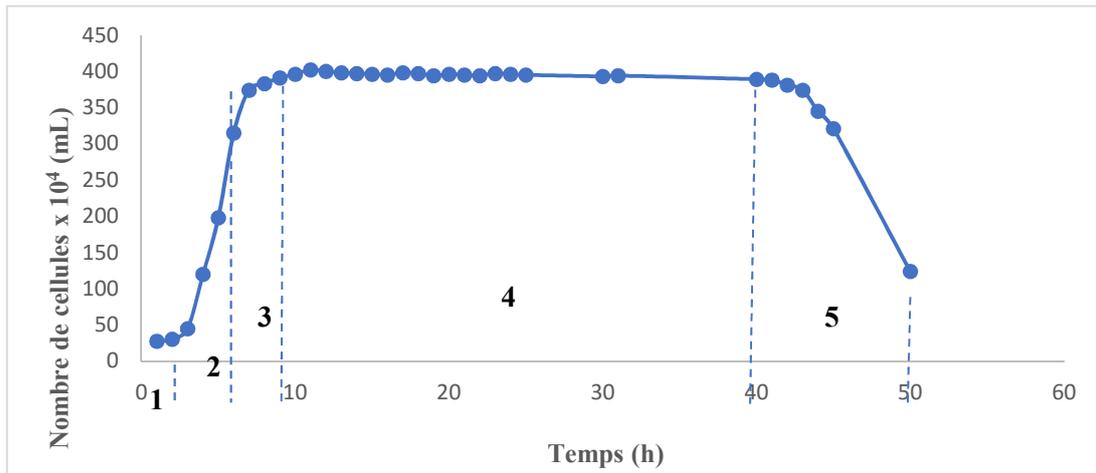


Figure 18 Courbe de croissance de *B. halotolerans*. 1 : Phase de latence ; 2 : Phase exponentielle ; 3 : Phase de ralentissement ; 4 : Phase stationnaire ; 5 : Phase de déclin.

4.6.3.2- Tolérance au sel, à la température et au pH

L'étude de la tolérance au sel a été étudiée en inoculant la souche *B. halotolerans* sur milieu LB additionné à différentes concentrations de NaCl. Le résultat obtenu a montré que *B. halotolerans* ayant une capacité à se développer en présence de fortes concentrations de sel atteignant les 100g/l. Cependant, un meilleur développement a été observé à une concentration de NaCl égale à 80 g/l ce qui confirme son caractère halophile.

Les tests de tolérance à la température effectués sur *B. halotolerans*, ont montré que cette bactérie peut se développer à des températures élevées à savoir, 35°C, 40°C, 45°C, 50°C et 55°C, ce qui confirme son caractère thermo-tolérant.

Le test de la tolérance de *B. halotolerans* à différentes valeurs du pH a révélé que cette bactérie s'est développée à des pH allant de 4 à 11, ce qui montre son caractère alcalin.

Sur la base des résultats obtenus, incluant l'étude pédologique, ainsi que la tolérance de *B. halotolerans* aux conditions élevées de pH, de température et de sel, il est suggéré qu'une adaptation spécifique à cet environnement a eu lieu. Cela indique que cette souche bactérienne isolée du sol autour de l'arbre de pin, peut prospérer dans des conditions que de nombreux autres microorganismes ne pourraient pas supporter. Par conséquent, on peut

raisonnablement considérer la zone où se trouve ce sol comme un environnement partiellement extrême.

Il est important de signaler que, selon nos connaissances, le présent travail est le premier à avoir isolé la souche de *B. halotolerans* (ON204239), à partir du sol autour de l'arbre de pin et de l'avoir exploité par rapport à sa dégradation de la matière lignocellulosique d'une part et son pouvoir antifongique d'autre part.

4.7- Etude de l'activité antagoniste de *B. halotolerans in vitro* en utilisant les surnageants de culture

L'étude de l'activité antifongique des surnageants issus de la mise en culture de la souche M4 dans deux milieux différents, à savoir : MA, contenant la paille d'avoine comme seule source de carbone et LB, milieu Luria-Bertani, a révélé des zones d'inhibition pour le surnageant LB de 12 et 15 mm de diamètre contre *F. napiforme* (ON204349) et *A. alternata* (ON714501) respectivement ; et des zones d'inhibition plus importantes dans le cas du surnageant MA (16 mm et 20 mm, respectivement contre *F. napiforme* et *A. alternata*) (Figure 19, figure 20).

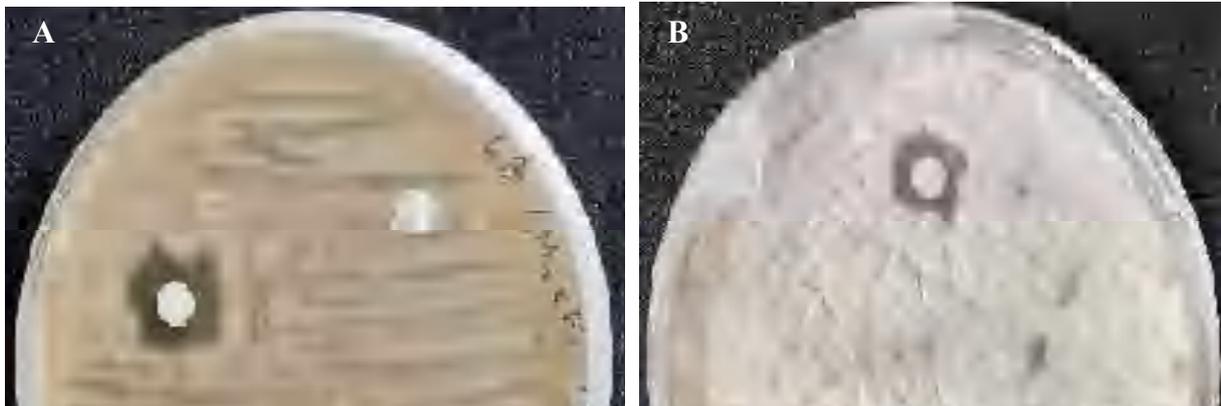


Figure 19 Activité antifongique de *B. halotolerans* vis-à-vis de : A, *F. napiforme* ; B, *A. alternata* en utilisant le surnageant de culture (Milieu LB).

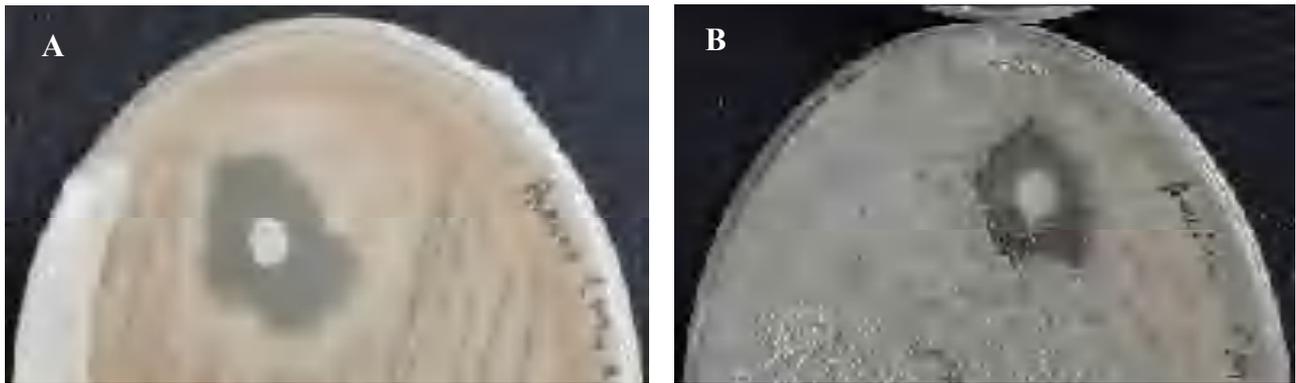


Figure 20 Activité antifongique de *B. halotolerans* vis-à-vis de : **A**, *F. napiforme* ; **B**, *A. alternata* en utilisant le surnageant de culture (Milieu avoine).

4.8- Modélisation

4.8.1- Optimisation des facteurs physico-chimiques influents l'activité antagoniste de *B. halotolerans* à l'aide du plan de Box-Behnken (BBD) et de la Méthode des Surfaces de Réponse (MSR)

L'activité antagoniste de *B. halotolerans* contre le phytopathogène *F. napiforme* est influencée par des paramètres physico-chimiques. En effet, dans la présente étude, le pH, la température, la concentration du substrat et le temps d'incubation sont censés optimiser l'activité antagoniste de *B. halotolerans* en utilisant le modèle BBD.

La Méthode des Surfaces de Réponses (MSR) permet de déterminer une relation d'approximation entre les variables d'entrée et les variables de sortie et les variations de la réponse vis-à-vis des facteurs d'influence significative. La réponse de sortie dépend de la variation des paramètres d'entrée qu'on appelle stimuli qui sont généralement représentés par des variables aléatoires notées $X_i, i = 1, \dots, n$, qui sont des variables de prédiction codées appelées facteurs et qui permettent de représenter les variations spatio-temporelles des paramètres d'entrée par des modèles mathématiques.

La représentation géométrique de cette relation d'approximation est appelée surface de réponse. La construction des surfaces de réponses est basée sur l'ajustement du modèle en utilisant des fonctions mathématiques telles que les polynômes. La méthode des surfaces de réponses passe par trois étapes : (i) plan expérimental, (ii) la modélisation de la réponse et (iii)

les représentations graphiques. La modélisation de la réponse est réalisée à l'aide de techniques de régression qui permettent de relier la réponse Y aux n variables aléatoires X_i par la relation ci-dessous :

$$Y = f(X_i)$$

La description des phénomènes étudiés, passe alors par une bonne approximation de cette fonction qui est obtenue par un polynôme du second degré comme expliqué dans la partie matériel et méthodes.

Dans le but de calculer les paramètres qui permettent de valider ou non le modèle établi, trois sommes sont définies : la somme des carrés résiduels (Sum of Squared Errors : SSE), la somme totale des carrés (Total Sum of Squared : SST) et la somme des carrés de la régression (Regression Sum Squared : SSR). Notons que $SST = SSR + SSE$. On définit alors, le coefficient de détermination R^2 par le rapport ci-dessous:

$$R^2 = \frac{SSR}{SST}$$

Ce coefficient de détermination, qui n'est autre que le carré du coefficient de corrélation R , est utilisé lorsque l'on cherche, dans cette régression linéaire, la force d'adéquation entre le modèle de la régression et les données expérimentales. Il est utile pour prévoir des événements futurs. Il constitue en fait, un indice de la qualité de la prédiction de la régression linéaire et agit comme une mesure pour valider la précision du modèle et son adéquation aux données. Sa valeur se situe entre 0 et 1. Des valeurs de R^2 proche de 1, signifient que la régression linéaire est en adéquation avec les données expérimentales et que le modèle prévoit correctement les nouvelles observations.

Dans le but de valider le modèle établi, il est nécessaire de faire des analyses statistiques en calculant le coefficient de détermination R^2 et le coefficient de détermination ajusté R_{aj}^2 .

Après l'étape de la modélisation, le modèle est représenté graphiquement à l'aide des courbes des surfaces de réponse qui font ressortir les variations des réponses en fonction des paramètres afin d'optimiser le système expérimental (paramètres de la réaction). Le logiciel MINITAB permet alors de déterminer les coefficients du polynôme pour chaque réponse. Le

degré de signification des coefficients a été déterminé à l'aide du test *Student* et de la valeur de p . La vérification des modèles ajustés a été réalisée par le coefficient de régression R^2 et sa significativité statistique a été faite par le t -test.

Les résultats issus des diverses expériences, ont montré une corrélation entre la variable de réponse Y , le pH X_1 , la concentration du substrat X_2 , la température X_3 et le temps de culture X_4 . Cette corrélation est représentée par l'équation polynomiale du second ordre suivante (Éq. 13) :

$$Y = 17,75 - 1,417X_1 + 1,333 X_2 - 1,917 X_3 - 1,667 X_2 - 5,96 X_1^2 - 0,33 X_2^2 - 5,71 X_3^2 - 6,08 X_4^2 - 0,50 X_1 \times X_2 - 0,75 X_1 \times X_3 - 0,00 X_1 \times X_4 - 0,00 X_2 \times X_3 + 0,50 X_2 \times X_4 + 0,50 X_3 \times X_4 \quad \text{Eq. 13}$$

L'analyse de variance ANOVA, a été employée pour évaluer la pertinence du modèle. Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau 12.

Dans cette étude, les valeurs expérimentales correspondaient aux valeurs attendues, aboutissant à une valeur de R^2 de 0,812, signifiant que 81,2% des variations de l'activité antagoniste pouvaient être expliquées par les variables. La valeur de Fisher, notée 'F' (Valeur $F = SS2r / SS2e$), représente le rapport de la moyenne des carrés du modèle à l'erreur résiduelle et constitue une mesure valide de la manière dont les facteurs décrivent la variation des données autour de leur moyenne. Les résultats obtenus ont montré que la valeur de Fisher $F = 4,01$ et la valeur de probabilité $p = 0,008$ (Tableau 12). Généralement, quand la Valeur de probabilité p est inférieur à 0,05 et quand cette dernière est associée à la valeur 'F', cela signifie que le modèle de régression est significatif.

Tableau 12 Analyse des variances (ANOVA).

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F	p
Modèle	14	596,000	42,571	4,01	0,008
Lin	4	122,833	30,708	2,89	0,065
pH	1	24,083	24,083	2,27	0,156
Concentration du substrat	1	21,333	21,333	2,01	0,180
Température	1	44,083	44,083	4,15	0,062
Temps d'incubation	1	33,333	33,333	3,14	0,100
Carré	4	467,917	116,979	11,02	0,000
pH*pH	1	213,010	213,010	20,07	0,001
Concentration du substrat*Concentration Substrat	1	0,667	0,667	0,06	0,806
Température*Température	1	195,510	195,510	18,42	0,001
Temps d'incubation *Temps d'incubation	1	222,042	222,042	20,92	0,001
Intéraction	6	5,250	0,875	0,08	0,997
pH*Concentration du Substrat	1	1,000	1,000	0,09	0,764
pH*Température	1	2,250	2,250	0,21	0,653
pH*Temps d'incubation	1	0,000	0,000	0,00	1,000
Concentration du Substrat *Température	1	0,000	0,000	0,00	1,000
Concentration du Substrat*Temps d'incubation	1	1,000	1,000	0,09	0,764
Température* Temps d'incubation	1	1,000	1,000	0,09	0,764
Erreur	13	138,000	10,615		
Manque d'ajustement	10	129,250	12,925	4,43	0,124
Erreur pure	3	8,750	2,917		
Total	27	734,000			

$R^2 = 81.20\%$, R^2 (adj) = 60.95%

DL: degrés de liberté; SC: somme des carrés ; CM: carré moyen; F: la loi de Fisher; p : la Valeur de probabilité.

Les représentations graphiques, telles que les diagrammes de surface de réponse en 3D, ont été générées pour comprendre les relations entre les quatre facteurs testés et pour identifier les paramètres optimaux permettant d'atteindre le niveau le plus élevé de l'activité antagoniste chez *B. halotolerans* (Figures 21 à 26).

Dans les diagrammes de surface des modèles quadratiques utilisés, deux variables sont maintenues constante à leurs valeurs médianes respectives et les deux autres variables prennent des valeurs dans les limites expérimentales. Ainsi, ces diagrammes permettent de mettre en évidence les effets linéaires, quadratiques et interactifs sur la variable de sortie, qui

dans notre cas est l'activité antagoniste. Les quatre variables d'entrée sont le pH, la concentration du substrat, le temps d'incubation et la température.

Les premières interprétations que nous pouvons donner aux surfaces de réponses obtenues sont :

- Lorsque le pH et le temps d'incubation sont fixés sur leurs valeurs médianes (pH=0 et Temps d'incubation =0), l'activité antagoniste admet un maximum en fonction de la température pour chaque valeur de la concentration de substrat (Figure 21), la valeur de ces maximums augmentent de manière quasi-linéaire en fonction de cette dernière.
- Lorsque la valeur de la concentration du substrat est fixée sur sa valeur médiane, alors l'activité antagoniste admet un maximum unique et ce, quel que soit la nature de la seconde variable fixe et la nature des deux autres variables changeantes (Figures 22, 24 et 25), ce qui signifie à notre sens que la valeur optimale de l'activité antagoniste sera obtenue lorsque la concentration du substrat est fixée sur sa valeur médiane.
- D'une manière générale lorsque la concentration du substrat augmente, la valeur optimale de l'activité antagoniste augmente de manière quasi-linéaire et ce, quel que soit la nature des variables d'entrées fixées ou changeantes (Figures 21, 23 et 26). Cependant, ces valeurs optimales correspondent à des valeurs bien précises des autres variables d'entrées.

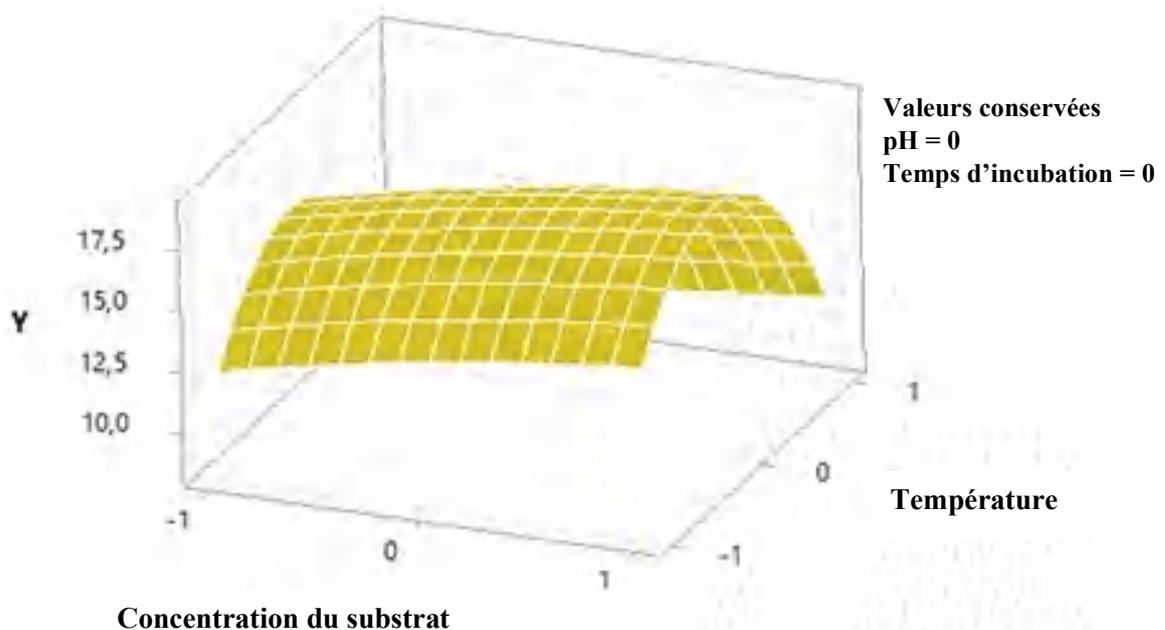


Figure 21 Relation entre la concentration du substrat (g) et la température (°C) sur l'activité antagoniste (mm).

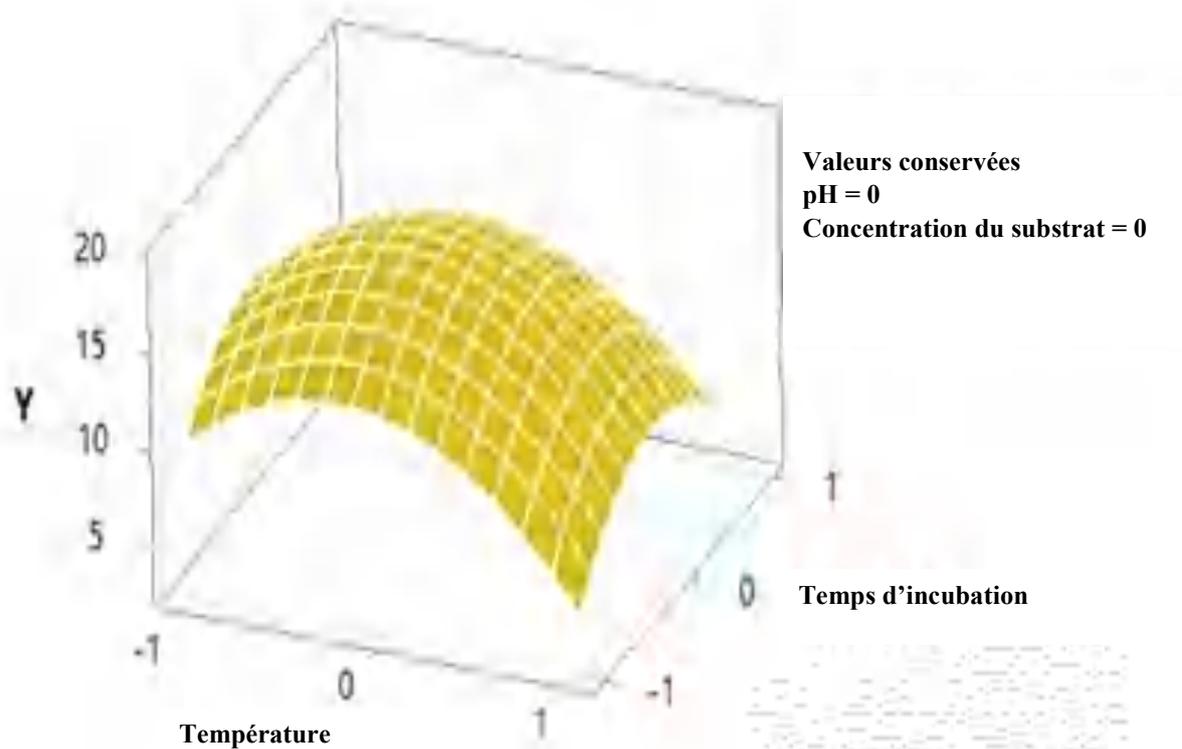


Figure 22 Relation entre la température (C°) et le temps d'incubation (h) sur l'activité antagoniste (mm).

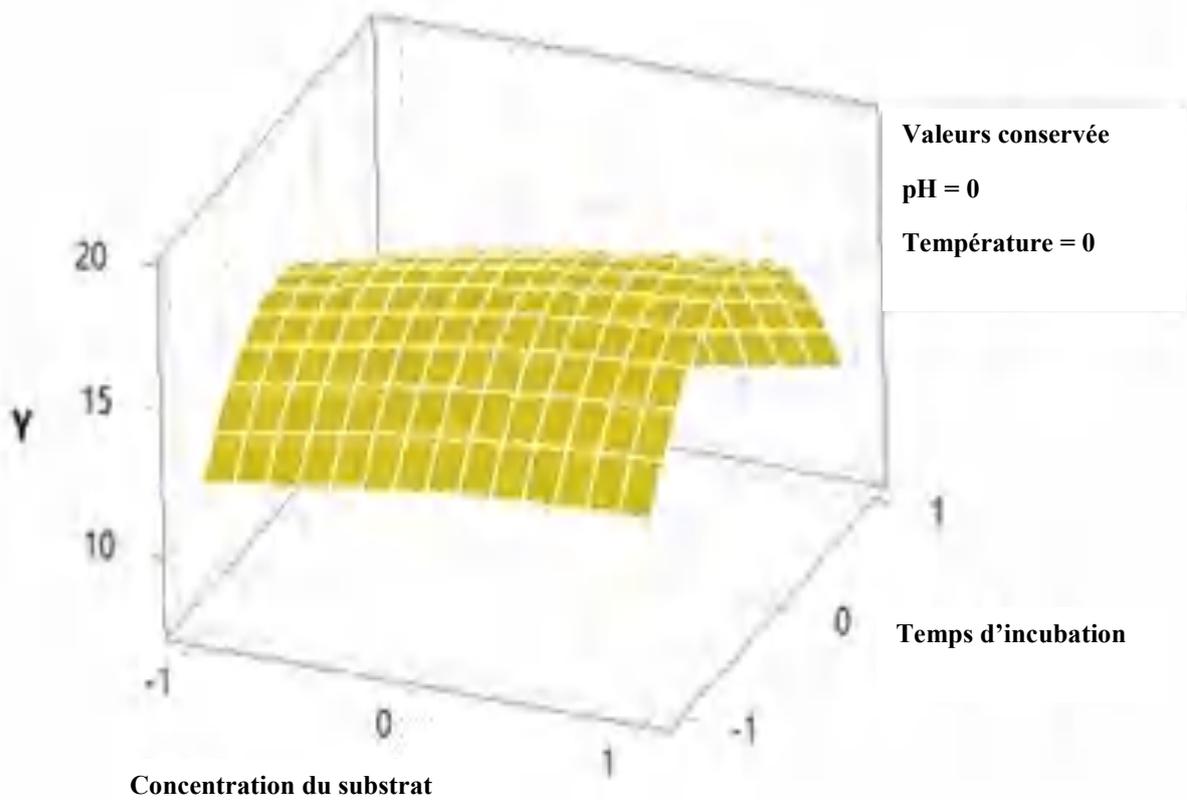


Figure 23 Relation entre la concentration de substrat et le temps d'incubation (h) sur l'activité antagoniste (mm).

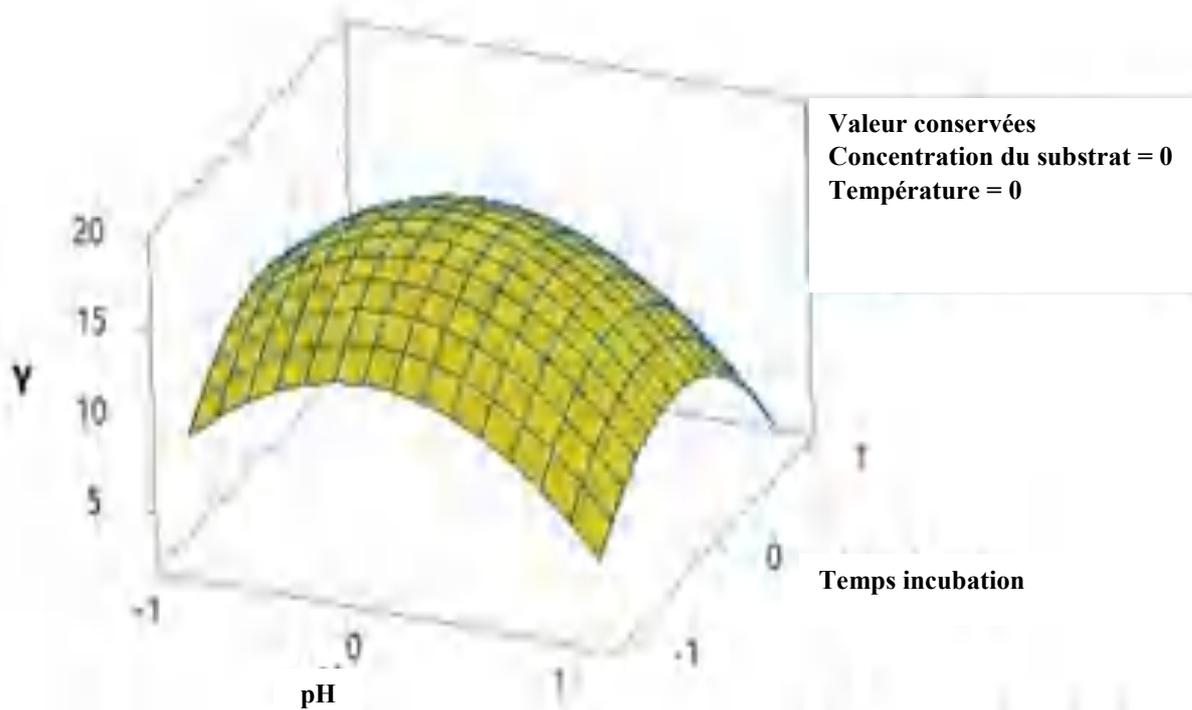


Figure 24 Relation entre pH et le temps d'incubation (h) sur l'activité antagoniste (mm).

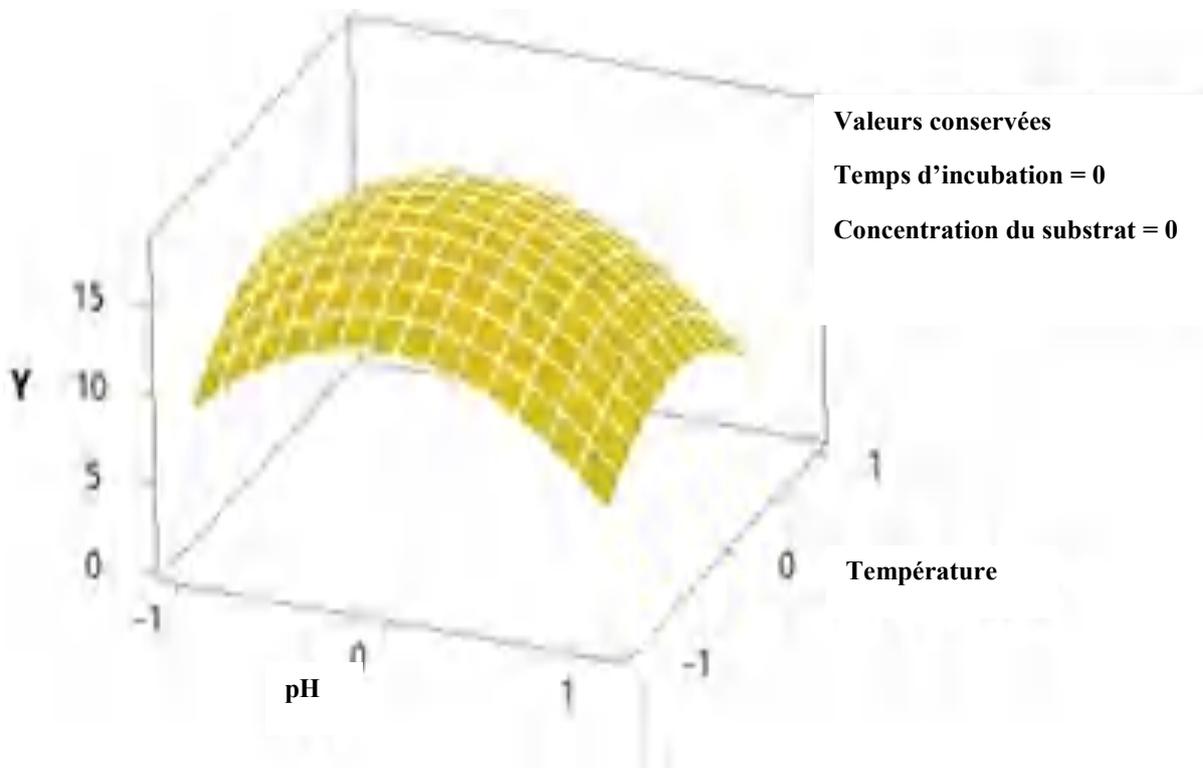


Figure 25 Relation entre le pH et la température sur l'activité antagoniste (mm).

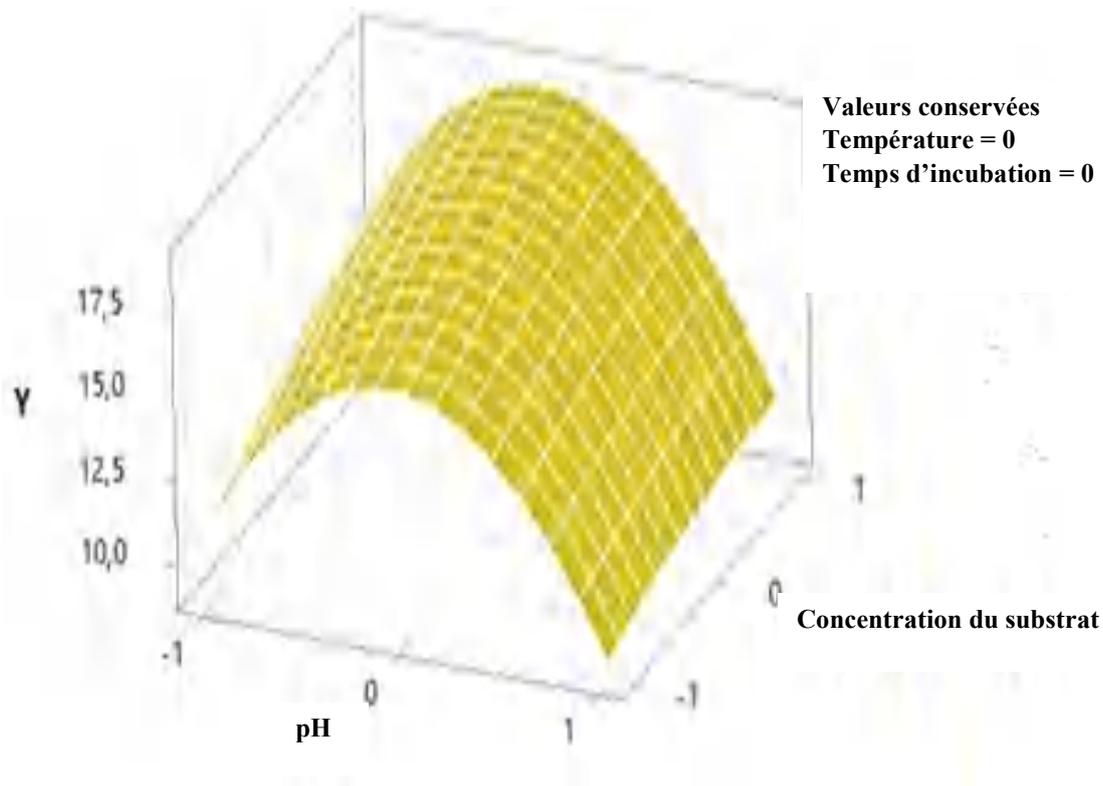


Figure 26 Relation entre le pH et la concentration du substrat sur l'activité antagoniste (mm).

L'ensemble des figures précédentes a permis de déterminer les valeurs optimales prédites : pH = 3,4 – Concentration du substrat = 7 g/L – température = 37,4°C – Temps d'incubation = 30 h et ce, pour une activité antagoniste dont le diamètre calculé était de 18 mm.

4.8.2- Modélisation à l'aide du système ANNs couplé à un algorithme génétique (GA)

Les principaux objectifs de cette étude consistent à créer un modèle robuste de réseaux de neurones artificiels (ANNs) afin d'optimiser l'activité antagoniste de *B. halotolerans* sur milieu à base d'avoine, tout en minimisant l'erreur moyenne entre les valeurs de sortie réelles et prédites.

La présente étude vise à étudier la fonction de transfert tangente-sigmoïdale pour les nœuds de la couche cachée et la fonction de transfert purement linéaire pour les nœuds de la couche de sortie. En effet, la fonction sigmoïde est utilisée dans les réseaux de neurones parce qu'elle prend des valeurs dans l'intervalle [0,1] comme les probabilités. Par ailleurs, sa

fonction inverse a une dérivée aisément calculable ce qui est essentiel pour améliorer les performances des algorithmes d'optimisation.

Ces fonctions de transfert surpassent les autres types de fonctions, ce qui aboutit à une faible Erreur Quadratique Moyenne (EQM) et les valeurs du coefficient de corrélation plus proche de l'unité.

Le nombre de neurones cachés est fixé avec soin, car il influence considérablement les performances de simulation et l'architecture optimale du réseau. Un faible nombre de neurones peut ralentir le processus de modélisation, au contraire un nombre excessif de ces derniers peut conduire à un sur-ajustement, qui risque d'inclure le bruit, dans les données utilisées lors de la phase d'apprentissage, réduisant ainsi la robustesse et la généralisation du modèle.

Une approche de minimisation des erreurs d'essai a été effectuée pour déterminer le nombre optimal de neurones cachés. Cette approche implique de comparer l'erreur calculée du réseau avec le résultat souhaité et d'ajuster en permanence les poids et les biais du réseau d'apprentissage jusqu'à ce que l'erreur quadratique moyenne soit la plus basse possible : le nombre spécifique de neurones cachés est alors atteint.

Le modèle établi par les réseaux de neurones artificiels couplé à un algorithme génétique, a permis de déterminer des valeurs optimales prédites : pH = 2,31 – Concentration du substrat = 7 g/L – Température = 37,4°C – Temps d'incubation = 30h et ce pour une activité antagoniste dont le diamètre calculé était égal à 18,5 mm.

4.8.3- Validation expérimentales des modèles

Les résultats obtenus respectivement à partir des deux modèles proposés (BBD-MSR et ANNs-GA) pour la prédiction des données de l'activité antagoniste (tableau 13) ont été comparés entre eux. Dans ce but, des ensembles d'expériences en triple ont été réalisées pour chacun des deux modèles. Les valeurs de sortie expérimentales ont ensuite été comparées aux réponses simulées prédites par les deux modèles.

Le modèle BBD-MSR utilisé, a permis de déterminer les paramètres expérimentaux optimaux : pH = 3,4 – concentration du substrat = 7 g/L – température = 37,4 °C – temps d'incubation = 30 h. Les valeurs optimales données par le modèle ANNs-GA étaient : pH = 2,3 – concentration du substrat = 7 g/L – température = 37,4 °C – temps d'incubation = 30 h.

Il est important de noter que les valeurs données par les deux modèles sont identiques à l'exception de la valeur du pH.

Sur la base de ces valeurs optimales respectives des deux modèles, l'activité antagoniste obtenue expérimentalement était de 18 mm et la valeur prédite par le modèle BBD-MSR était de 19,11mm et de 18,5 mm pour l'ANNs-GA alors que la valeur prédite par ce modèle était de 19,21 mm. Ces résultats (Tableau 13) valident les deux modèles du fait que les écarts relatifs entre les valeurs expérimentales et prédites sont faibles. Cependant, les optimaux obtenus avec ANNs-GA ont permis d'obtenir une activité antagoniste plus élevée qu'avec la modélisation basée sur BBD-MSR. En effet, le modèle de surface de réponse semble être limité par la régression polynomiale du second ordre. Aussi, la modélisation par ANNs-GA semble être la plus appropriée pour prédire l'activité antagoniste de *B. halotolerans*.

Tableau 13 Configuration des facteurs avec les valeurs de réponse prédites et expérimentales.

Facteurs	Valeur réelle de l'optimum prédit	Valeur max. Désirabilité	Valeur Y (mm)	Valeur expérimentale (mm)	Y
BBD-MSR			19.11		18
pH	3.4				
Concentration du substrat	7				
Température	37.43				
Temps d'incubation	30				
ANNs-GA			19.21		18.5
pH	2.31				
Concentration du substrat	7				
Température	37.4				
Temps d'incubation	30				

4.9- Application de la souche bactérienne sélectionnée comme agent de biocontrôle

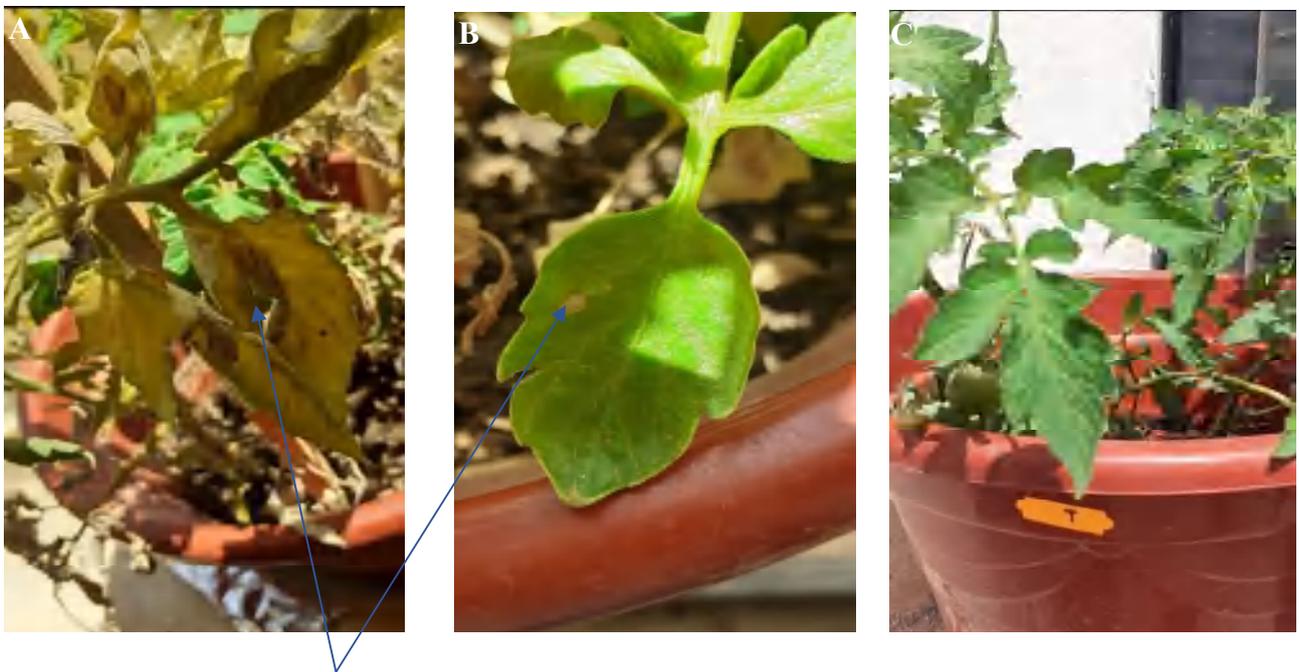
L'effet de la souche *B. halotolerans* sur la croissance et protection des plants de tomates contre le phytopathogène *F. napiforme*, a été étudié dans les conditions de pots et en plein champs.

4.9.1- Test de pathogénicité

Des plants de tomate sains ont été trempés dans une suspension sporale de *F. napiforme* et d'autre pulvérisés par une suspension sporale de *A. alternata* au niveau de la partie aérienne, afin de confirmer l'effet phytopathogène des ces moisissures. Le résultat après 3 semaines d'incubation, a montré que parmi les 9 plants traités par *F. napiforme*, huit (8) d'entre eux étaient morts (Figure 27 A et B) tandis que les plants de tomates traités par *A. alternata* ont développé des taches marrons à la surface des feuilles (Figure 28 A et B)



Figure 27 Test de pathogénicité : **A et B**, plants de tomates infectés par *F. napiforme* ; **C**, plants de tomate témoin.



Taches marron

Figure 28 Test de pathogénicité : **A et B**, Feuilles infectées par *A. alternata* ; **C**, Feuilles témoin (Non infectées par *A. Alternata*)

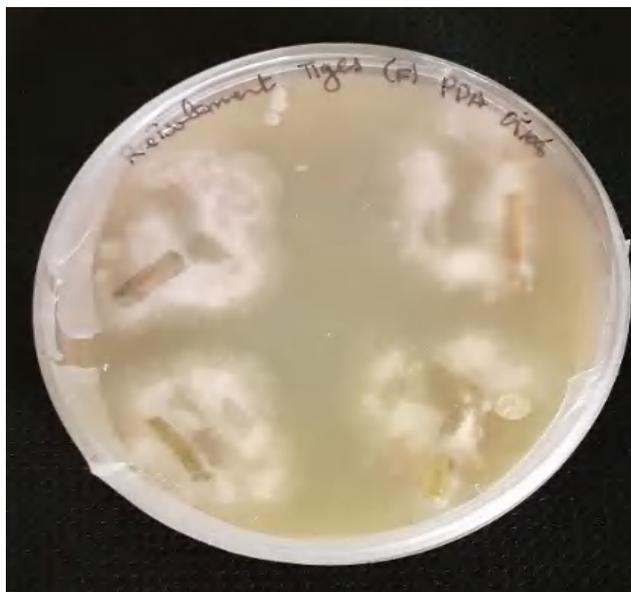
L'analyse des résultats obtenus ont montré que *F. napiforme* a infecté les racines et les tiges. En second lieu un flétrissement plus prononcé a été observé puis un jaunissement progressif des feuilles et enfin la mort des plants. Le calcul de l'indice de la maladie provoqué par *F. napiforme* est égal à 88,9%.

Les symptômes provoqués par le phytopathogène *A. alternata*, se sont manifestés d'abord par de petites ponctuations qui apparaissent à l'emplacement de l'inoculum et qui marquent la réaction des tissus suite à la pénétration du champignon. Après un délai de 20 jours, l'envahissement des tissus a eu lieu et s'est traduit par des taches marron (Figure 28 A et B).

RESULTATS

Ces taches ont un diamètre qui varie entre 0,8 et 1,5 cm, se développant en forme d'anneaux concentriques caractérisant l'*Alternariose*. Les plantules témoins (saines) maintenues dans les mêmes conditions en absence d'inoculation n'ont manifesté aucun symptôme (Figure 28 C). Le calcul de l'indice de la maladie provoquée par *A. alternaria* est compris entre 11 et 25%.

Dans le but de s'assurer que les phytopathogène sont responsables des symptômes observés sur les plants de tomate, un ré-isolement a été effectué à partir de fragments de feuilles, de tiges et de racines de ces derniers et ensemencés sur milieu gélosé (PDA). Après une semaine d'incubation à 28 °C, des colonies typiques de *F. napiforme* et *A. alternata* inoculés se sont développées autour des fragments des feuilles, des tiges et des racines (Figures 29 et 30). De ce fait, ce test à confirmer que les dégâts enregistrés sur les feuilles, les tiges et les racines sont provoqués par les même phytopathogènes.



A. aspect macroscopique



B. aspect microscopique (X40)

Figure 29 Ré-isolement du phytopathogène *F. napiforme*.

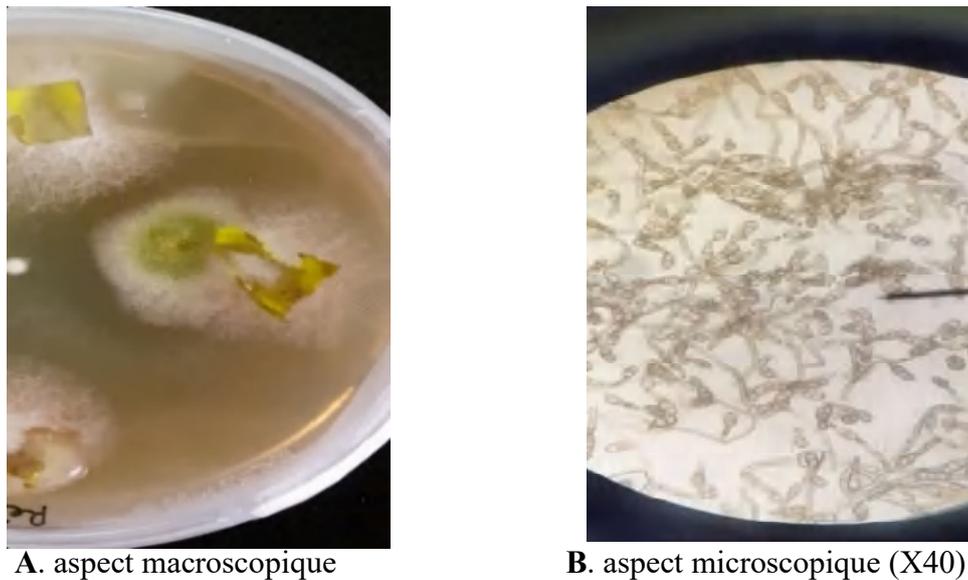


Figure 30 Ré-isolement du phytopathogène *A. alternata*.

4.9.2- Test *in vivo*

L'activité antagoniste *in vivo* des surnageants du *B. halotolerans* issus de la culture sur milieux LB et MA a été testée contre *F. napiforme* compte tenu des dégâts aigus qu'il a provoqué sur les racines et les tiges des plantules.

4.9.2.1- Conditions de pots

Le traitement des plantules des tomates avec la suspension bactérienne de *B. halotolerans* (10^7 cellules/mL) préalablement ensemencé sur milieu LB a montré son efficacité à promouvoir la croissance et à protéger les plants de tomate contre l'agent phytopathogène de la Fusariose, en comparaison avec le témoin qui a été seulement traité avec *F. napiforme*. En effet, la taille moyenne des plants de tomates en absence de l'antagoniste était égale à (26 ± 3) cm tandis qu'en présence de l'antagoniste, la taille moyenne était de (38 ± 4) cm, en ce qui concerne le nombre moyen de feuilles, ce dernier était de (44 ± 10) feuilles pour le témoin et de (56 ± 10) feuilles en présence de *B. halotolerans*. Par ailleurs la protection conférée par *B. halotolerans* contre *F. napiforme* a montré que le nombre moyen des feuilles décolorées était égal à 10 ± 4 chez le témoin et égale à (6 ± 2) chez les plants traités par *B. halotolerans*. La moyenne de la masse racinaire des plants de tomates traités par *B. halotolerans* était égale à 11,50 g contre 1,20 g pour le témoin (Tableau 14, figure 31).

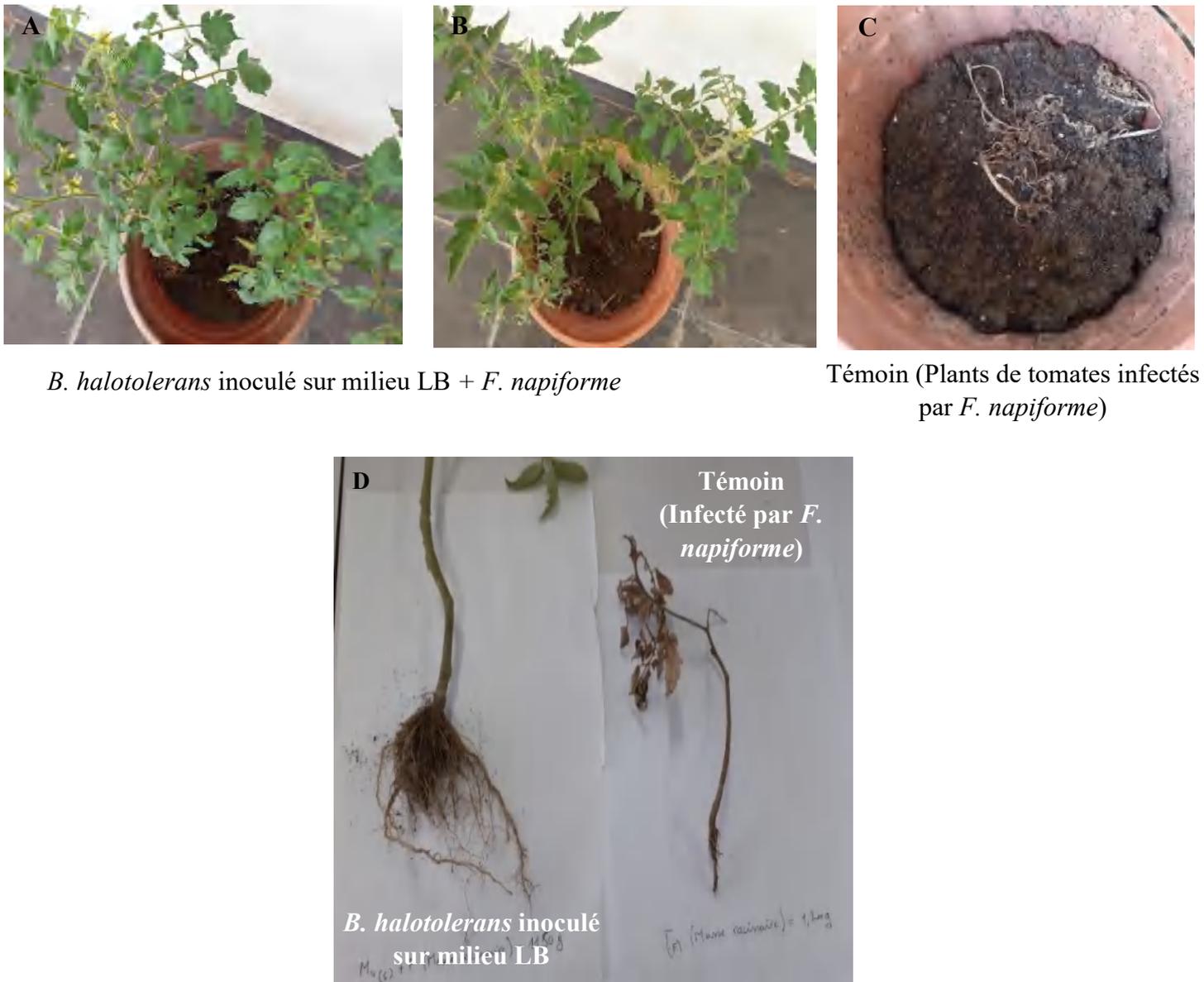


Figure 31 A et B, effet antagoniste de *B. halotolerans* contre le phytopathogène *F. napiforme* ; C, témoin ; D, comparaison de la masse racinaire. Après 3 semaines d'incubation dans les conditions de pots (Milieu LB).

Par ailleurs, le traitement des plants de tomates par *B. halotolerans* préalablement inoculé sur milieu (MA), a montré un effet significatif en comparaison avec le témoin (traité uniquement par le phytopathogène *F. napiforme*). En effet, la taille moyenne des plants de tomates en présence de l'antagoniste était égale à (40 ± 6) cm en comparaison avec le témoin (26 ± 3) cm. Par ailleurs, le nombre moyen de feuilles était de (68 ± 8) en présence de *B. halotolerans* et de (44 ± 6) feuilles pour le témoin. Le nombre moyen de feuilles décolorées était égale à (4 ± 2) en présence de l'antagoniste et égale à (10 ± 6) chez le témoin. Enfin, la

RESULTATS

moyenne de la masse racinaire des plants de tomates traités par *B. halotolerans* était égale à 15,29 g contre 1,20 g pour le témoin (Tableau 14, figure 32).

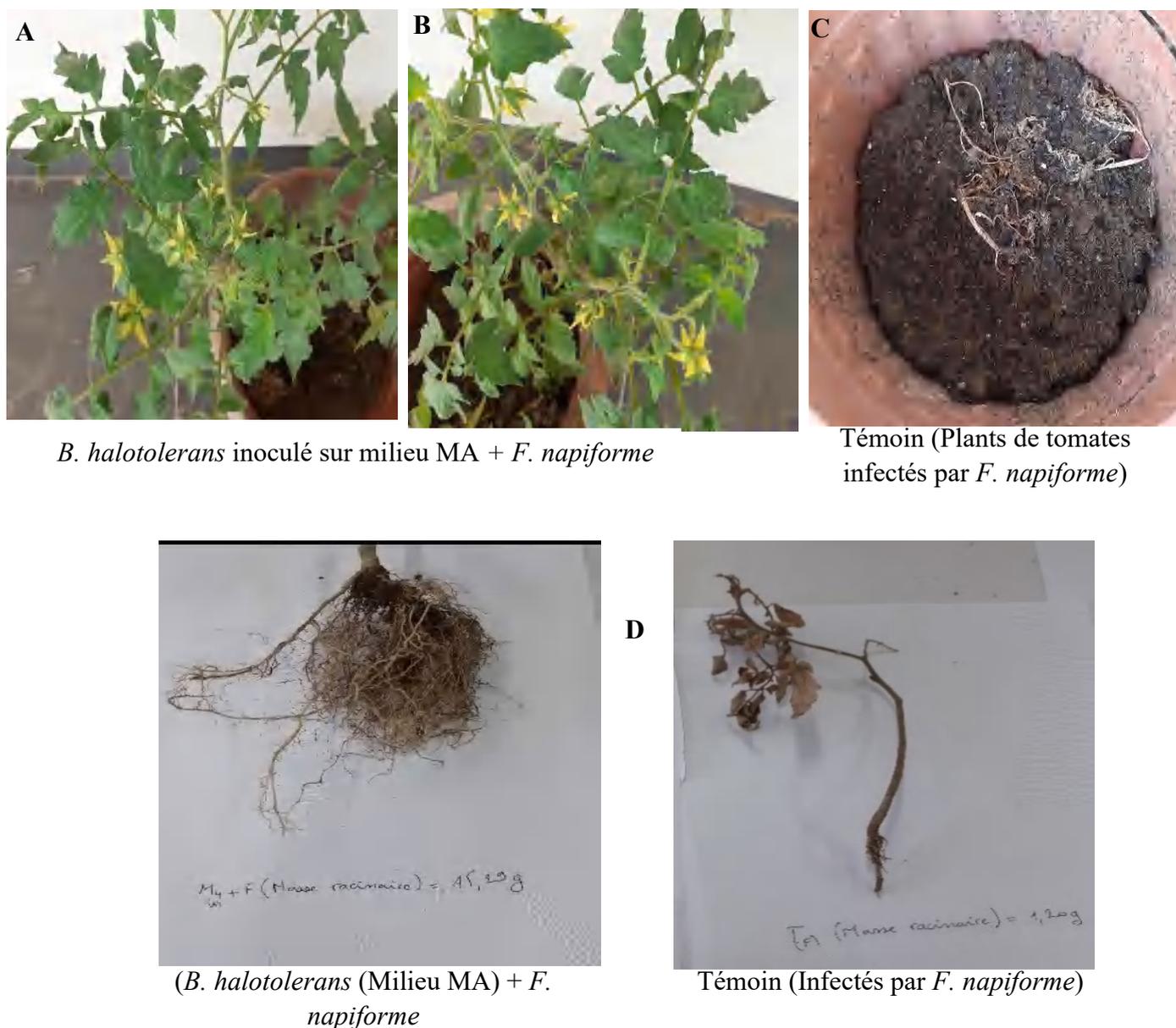


Figure 32 A et B, effet antagoniste de *B. halotolerans* contre le phytopathogène *F. napiforme* ; C, témoin ; D, comparaison de la masse racinaire. Après 3 semaines d'incubation dans les conditions de pots (Milieu MA).

Tableau 14 Comparaison entre l'effet de *B. halotolerans* (Milieu MA) et *B. halotolerans* (Milieu LB) sur les plants de tomates contre le phytopathogène *F. napiforme* après 3 semaines d'incubation.

Paramètres	<i>B. halotolerans</i> (Milieu MA)	<i>B. halotolerans</i> (Milieu LB)
Taille moyenne des plants (cm)	40±5	38±4
Nombre moyen de feuilles	68±8	56±10
Nombre moyen de feuilles décolorées	4 ± 2	6±2
Nombre moyen de fleurs	-	-
Masse racinaire moyenne (g)	15,29	11,50

4.9.2.2- Tests *in vivo* en conditions de champ

4.9.2.2.1- Effet de *B. halotolerans* préalablement cultivé sur le milieu MA

Les résultats du test *in vivo* en plein champs ont montré que le traitement des plants avec *B. halotolerans* préalablement cultivé dans le milieu MA avait un effet significatif sur tous les paramètres étudiés et ce, pour la durée de la culture allant de la semaine 4 jusqu'à la semaine 12. En effet, à la fin de la culture la taille moyenne des plants était de (52 ± 21) cm contre (16 ± 14) cm dans le lot témoin où les plants de tomates ont été infectés uniquement avec *F. napiforme*.

De plus, les nombres moyens de feuilles, de feuilles décolorées, de fleurs et des fruits étaient respectivement de (82 ± 7) , (31 ± 13) , (20 ± 6) et de 10 fruits, contre (43 ± 25) , (35 ± 14) , (13 ± 6) et 2 fruits dans le lot témoin. Il est important de préciser qu'à la fin de la culture, 4/18 plants uniquement sont restés vivants dans le lot témoin contre 16/18 plants dans le lot traité et que la masse racinaire moyenne était de (80 ± 26) g (antaguniste) contre (49 ± 25) g pour le témoin (Figure 33 tableau 15).



Figure 33 Effet antagoniste de *B. halotolerans* inoculé sur milieu MA sur la protection des plantes de tomate « variété Louiza » contre le phytopathogène *F. napiforme*. (A) Lot traité par *B. halotolerans*, (B) Lot témoin infecté par *F. napiforme*. (C) À gauche la masse racinaire des plantes du lot traité ; à droite la masse racinaire du Lot témoin (B) à la fin de culture.

Tableau 15 Effet de *B. halotolerans* (Milieu MA) sur les plants de tomates contre le phytopathogène *F. napiforme* après 4, 8 et 12 semaines d'incubation en plein champ

Paramètres	Période	Souche		Différence significative
		<i>B. halotolerans</i> (Milieu MA)	Témoin	
Moyenne de la taille des plants (cm)	Semaine 4	29 ± 6	9 ± 4	P<0,05
	Semaine 8	43 ± 19	15 ± 10	P<0,05
	Semaine 12	52 ± 21	16 ± 14	P<0,05
Moyenne du nombre de feuilles	Semaine 4	58 ± 18	16 ± 11	P<0,05
	Semaine 8	67 ± 8	21 ± 13	P<0,05
	Semaine 12	82 ± 7	43 ± 25	P<0,05
Moyenne du nombre de feuilles décolorées	Semaine 4	/	/	/
	Semaine 8	41 ± 15	15 ± 6	P<0,05
	Semaine 12	31 ± 13	35 ± 14	P<0,05
Moyenne du nombre de fleurs	Semaine 4	/	/	/
	Semaine 8	11 ± 8	10 ± 6	P>0,05
	Semaine 12	20 ± 6	13 ± 6	P<0,05
Nombre de fruits poussés	Semaine 4	/	/	/
	Semaine 8	/	/	/
	Semaine 12	10	2	P<0,05
Moyenne du poids des fruits (g)	Semaine 4	/	/	
	Semaine 8	/	/	
	Semaine 12	32 ± 16	(10 ± 7)	P<0,05
Nombre de plants poussés	Semaine 4	17	7	
	Semaine 8	16	6	
	Semaine 12	16	4	
Moyenne de la masse racinaire (g)	Semaine 4	/	/	
	Semaine 8	/	/	
	Semaine 12	80 ± 26	49 ± 25	P<0,05

4.9.2.2.2- Effet de *B. halotolerans* préalablement cultivé sur le milieu LB

Les résultats du test *in vivo* en plein champs ont montré que le traitement des plants avec *B. halotolerans* préalablement cultivé sur le milieu LB avait un effet significatif positif sur tous les paramètres étudiés et ce pour la durée de la culture allant de la semaine 4 jusqu'à la semaine 12. En effet, à la fin de culture la taille des moyenne des plants était de (24 ± 13) cm contre (16 ± 14) cm dans le lot témoin ou les plants de tomates ont été infectés uniquement avec *F. napiforme*. En plus les nombres moyens de feuilles, de feuille décolorées, de fleurs et de fruits étaient respectivement de (56 ± 10), (25 ± 12), (18 ± 12) et 7 fruits contre, (43 ± 25), (35 ± 14), (13 ± 6) et 2 fruits dans le lot témoin. De plus, il est

RESULTATS

important de préciser qu'à la fin de culture, uniquement 4/18 plants de tomate sont restés vivants dans le lot témoin contre 8/18 plants dans le lot traité et que la masse moyenne des fruits était de (27 ± 13) g (antagoniste) contre (13 ± 6) g pour le témoin et que la masse racinaire moyenne était de (70 ± 14) g (antagoniste) contre (49 ± 25) g pour le témoin (Figure 34, tableau 16).

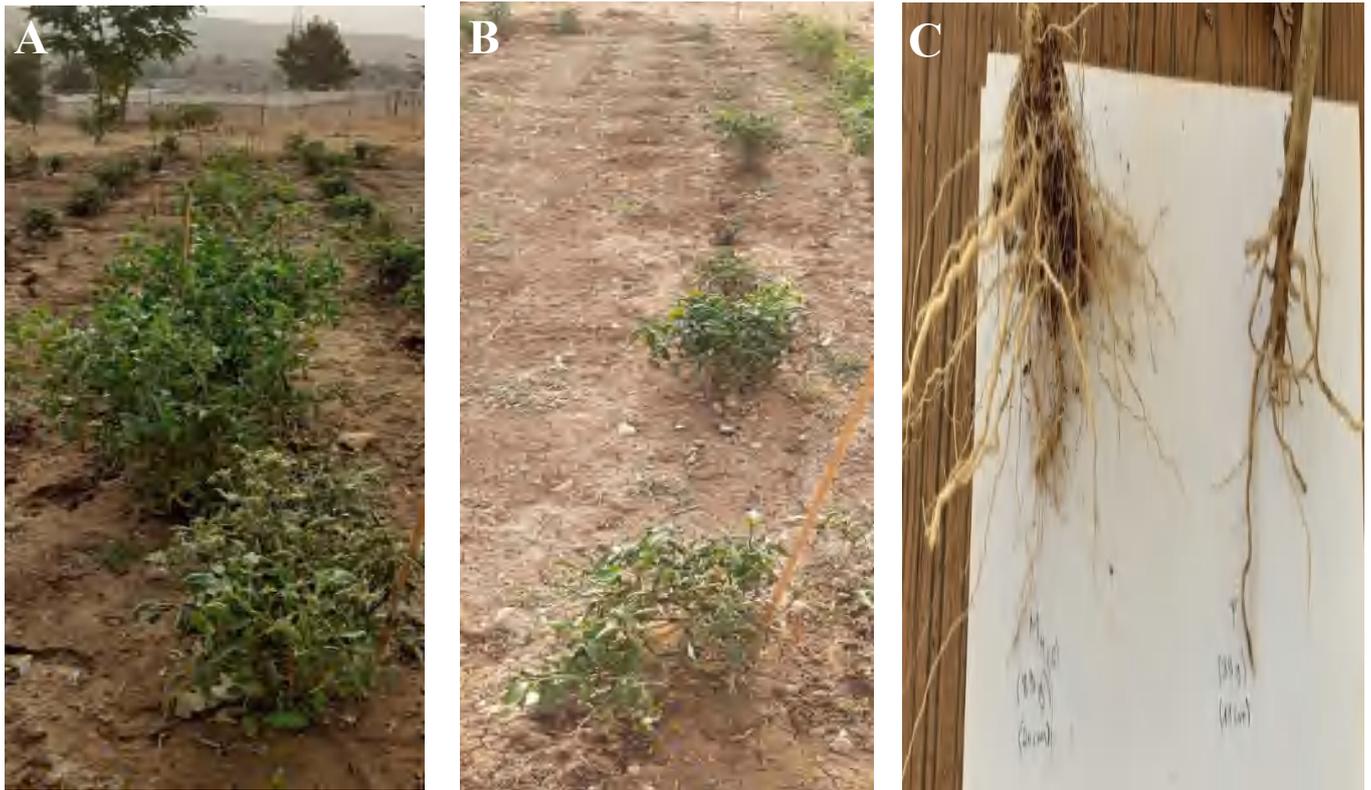


Figure 34 Effet antagoniste de *B. halotolerans* inoculé sur milieu LB sur la protection des plantes de tomate « variété Louiza » contre le phytopathogène *F. napiforme*. (A) Lot traité par *B. halotolerans*, (B) Lot témoin infecté par *F. napiforme*. (C) À gauche la masse racinaire des plantes du lot traité ; à droite la masse racinaire du Lot témoin (B) à la fin de culture.

RESULTATS

Tableau 16 Effet de *B. halotolerans* (Milieu LB) sur les plants de tomates contre le phytopathogène *F. napiforme* après 4, 8 et 12 semaines d'incubation en plein champ.

Paramètres	Période	Souche		Différence significative
		<i>B. halotolerans</i> (Milieu LB)	Témoin	
Moyenne de la taille des plants (cm)	Semaine 4	10 ± 7	9 ± 4	P<0,05
	Semaine 8	18 ± 16	15 ± 10	P<0,05
	Semaine 12	24±13	16±14	P<0,05
Moyenne de feuilles	Semaine 4	20±10	16± 11	P<0,05
	Semaine 8	34 ± 20	21 ± 13	P<0,05
	Semaine 12	56±10	43 ± 25	P<0,05
Moyenne de feuilles décolorées	Semaine 4	/	/	/
	Semaine 8	20 ± 15	15 ± 6	P<0,05
	Semaine 12	25 ±12	35±14	P<0,05
Moyenne de fleurs	Semaine 4	/	/	/
	Semaine 8	13 ± 6	10 ± 6	P>0.05
	Semaine 12	18±12	13± 6	P>0.05
Moyenne de fruits poussés	Semaine 4	/	/	/
	Semaine 8	/	/	/
	Semaine 12	7	2	/
Moyenne du poids des fruits (g)	Semaine 4	/	/	/
	Semaine 8	/	/	/
	Semaine 12	27 ± 13	10 ± 7	P<0.05
Moyenne de plants poussés	Semaine 4	8	7	P>0.05
	Semaine 8	8	6	P>0.05
	Semaine 12	8	4	P<0.05
Moyenne de la masse racinaire (g)	Semaine 4	/	/	/
	Semaine 8	/	/	/
	Semaine 12	70 ± 14	49 ± 25	P<0,05

B. halotolerans cultivé sur milieu MA était plus efficace dans la promotion de croissance et la protection des plants de tomate en comparaison à sa culture sur milieu LB.

En effet, après 12 semaines de culture le nombre de plants en vie était de 16/18 contre 8/18, la taille moyenne des plants a atteint (52 ± 20) cm contre (24 ± 13) cm, et le nombre moyen de feuilles, de feuilles décolorées de fleurs et de fruits était de (82 ± 7), (31 ± 13), (20 ± 6) et de 10 fruits contre (56 ± 10), (25 ± 12), (18 ± 12) et de 7 fruits et enfin le poids moyen des racines et des tomates était de (32 ± 16) g et (80 ± 26) contre (27 ± 13) g et (70 ± 14) g respectivement (Tableau 17).

RESULTATS

Tableau 17 Comparaison entre l'effet de *B. halotolerans* (Milieu MA) et *B. halotolerans* (Milieu LB) sur les plants de tomate contre le phytopathogène *F. napiforme* après 12 semaines d'incubation en plein champ.

Paramètre	<i>B. halotolerans</i> (Milieu MA)	<i>B. halotolerans</i> (Milieu LB)
Taille moyenne des plants (cm)	52 ±21	24±13
Nombre moyen de feuilles	82±7	56±10
Nombre moyen de feuilles décolorées	31 ± 13	25±12
Nombre moyen de fleurs	20±6	18±12
Nombre moyen de tomate qui ont poussé	10	7
Poids moyen des tomates (g)	32 ± 16	27 ± 13
Nombre de plants poussés	16	8
Masse racinaire moyenne (g)	80 ± 26	70 ± 14

De plus, les fruits de tomates issus des plantes ayant poussé dans le lot témoin présentaient une teinte verdâtre, en contraste avec le lot traité avec les milieux MA ou LB où les fruits récoltés arboraient une couleur rouge vibrante (Figure 35). Cette observation démontre de manière éloquent, l'impact positif du traitement sur la qualité des fruits. Le milieu MA semble avoir favorisé une maturation plus complète et homogène des tomates, se traduisant par une couleur plus attrayante et probablement une saveur plus intense.

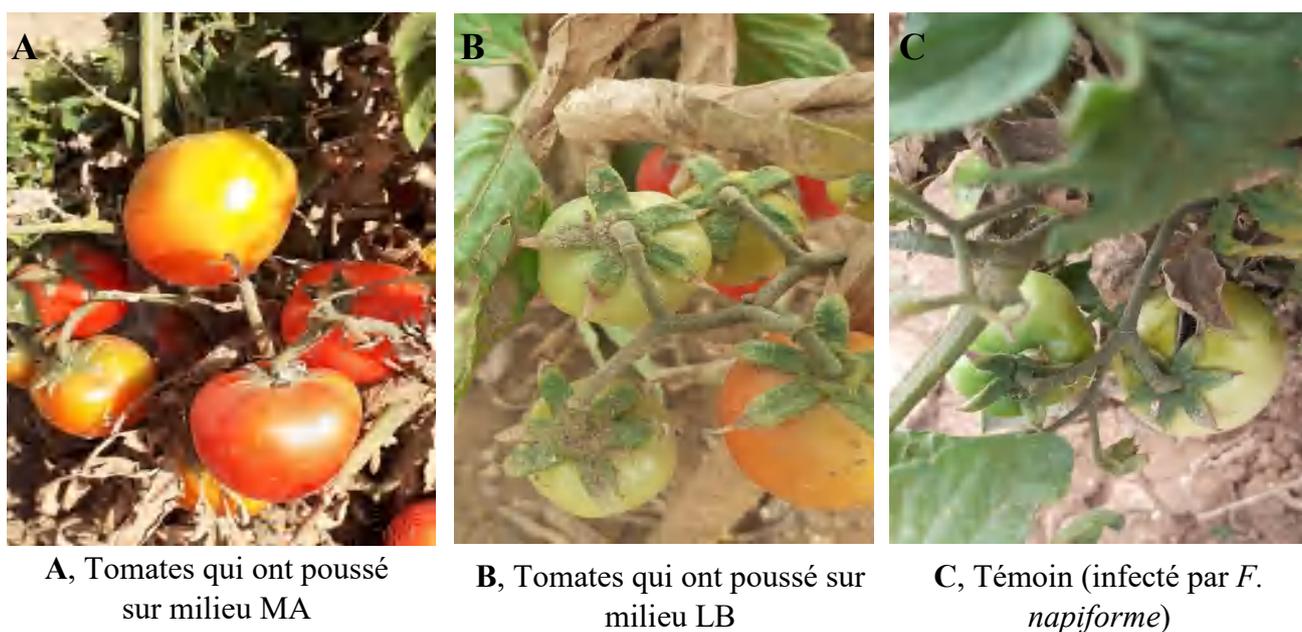


Figure 35 Tomates qui ont poussé après 12 semaines d'incubation

Sur la base des résultats obtenus, qui ont mis en évidence l'effet significatif de *B. halotolerans* inoculé sur milieu avoine comme seule source de carbone, tant *in vitro* que *in vivo*, aussi bien en conditions de pots qu'en plein champ dans la protection des plants de tomates contre le phytopathogène *F. napiforme* comparativement à l'inoculation de *B. halotolerans* sur milieu LB.

L'utilisation de l'avoine s'est donc révélé être un substrat intéressant pour maximiser l'effet antagoniste de *B. halotolerans* d'abord, du fait de son abondance en biomasse ligno-cellulosique et de sa disponibilité au niveau national. De plus l'utilisation d'un substrat naturel avec l'avoine comme seule source de carbone favorise le respect de l'environnement.

4.10- Évaluation de l'effet antagoniste de *B. halotolerans* vis-à-vis de *F. napiforme* par microscopie à épifluorescence

Les résultats de l'observation de l'interaction *B. halotolerans*-*F. napiforme* après 7 jours de leur inoculation sur milieu PDA, par le microscope à épifluorescence, a révélé un changement morphologique important dans les conidies et des déformations substantielles dans les hyphes de *F. napiforme* causés par *B. halotolerans*. Une inhibition de la formation et de la croissance des hyphes a également été observée (Figure 36).

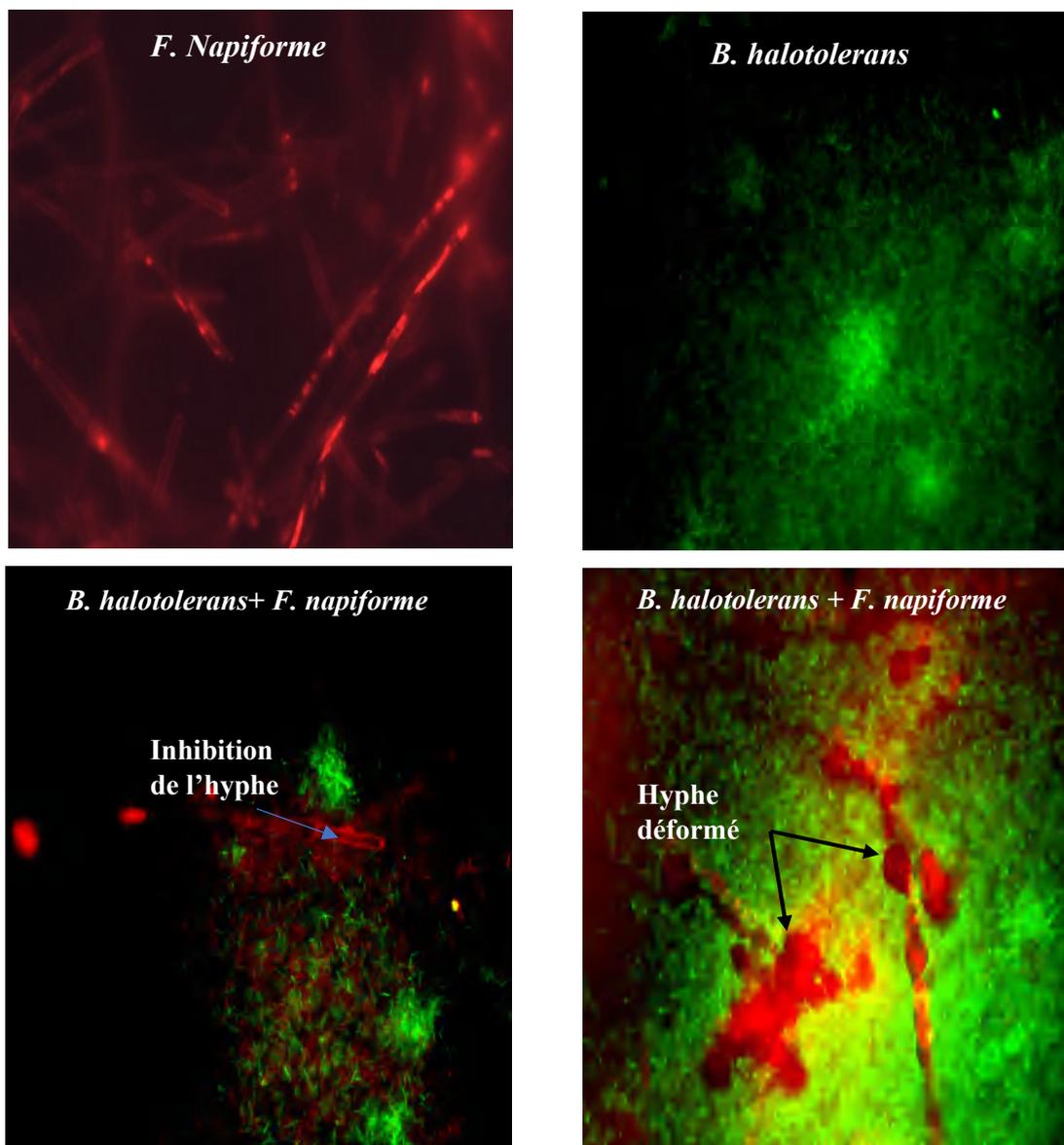


Figure 36 Évaluation de l'effet antagoniste de *B. halotolerans* vis-à-vis de *F. napiforme* par microscopie à épifluorescence (X60).

4.11- Analyse des Lipopeptides par UPLC/MS

L'interprétation des profils UPLC des surnageants de *B. halotolerans* a permis de montrer que ce dernier a produit des surfactines et des iturines lorsqu'il était cultivé sur milieu MA alors que sur milieu LB, il n'a produit que des surfactines. Il est à préciser qu'aucune trace de fengycines n'a été détecté sur les deux milieux de culture (Figure 37).

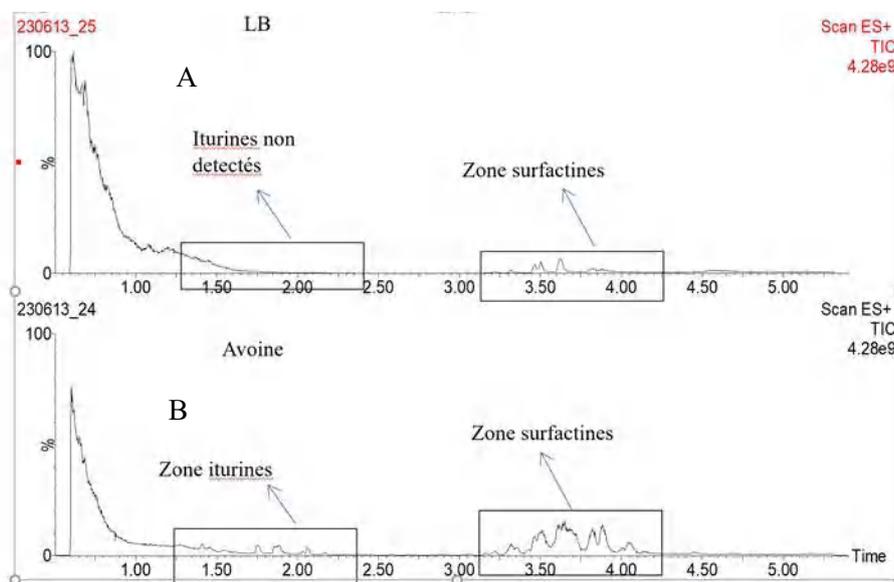


Figure 37 Profils UPLC de production des lipopetides par *B. halotolerans* sur milieu LB (A) et sur milieu MA (B).

L'analyse des échantillons par UPLC-MS, a montré la capacité de *B. halotolerans* à produire différents analogues de surfactine (C12, C13, C14, C15, C16, C17 et C18) en quantités significatives sur le milieu à base d'avoine comme seule source de carbone, avec une proportion plus élevée pour les analogues C15 et C16 en comparaison avec les autres analogues produits (Figure 38). En revanche, Sur le milieu LB la production des surfactines était limitée à cinq analogues produits (C12, C13, C14, C15 et C16) avec une proportion plus élevée de C15 en comparaison avec les autres analogues produits (Figure 39). Il est important de signaler qu'à notre connaissance, que c'est la première fois que *B. halotolerans* produit des biosurfactants sur milieu à base d'avoine comme seule source de carbone. La figure 40 montre une superposition des chromatogrammes obtenus pour les surfactines produites sur milieu optimisé à base d'avoine et sur milieu LB. Les résultats montrent que *B. halotolerans* inoculé sur milieu naturel, produit une plus grande quantité de surfactines avec différents analogues par rapport à *B. halotolerans* inoculé sur milieu LB. La figure 41 représente les spectres de masse de quelques surfactines analogues produites par *B. halotolerans*.

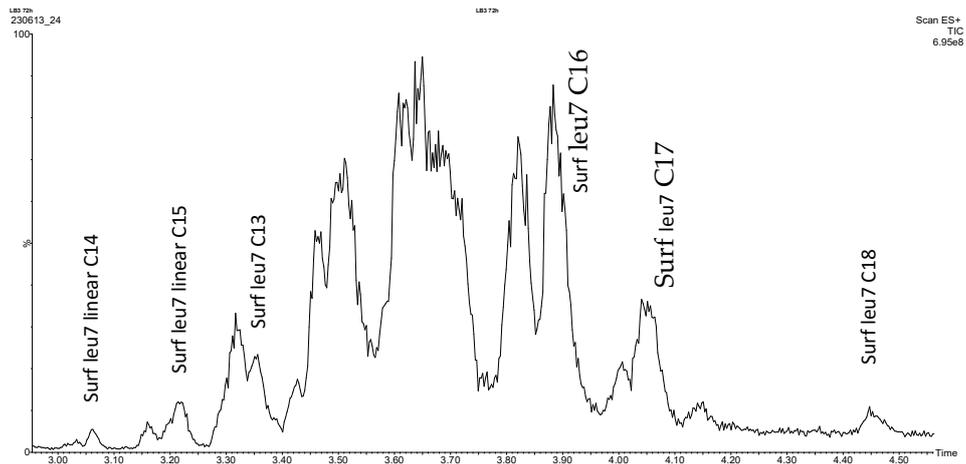


Figure 38 Chromatogrammes correspondant aux surfactines produits par *B. halotolerans* sur milieu MA analysés par UPLC/MS.

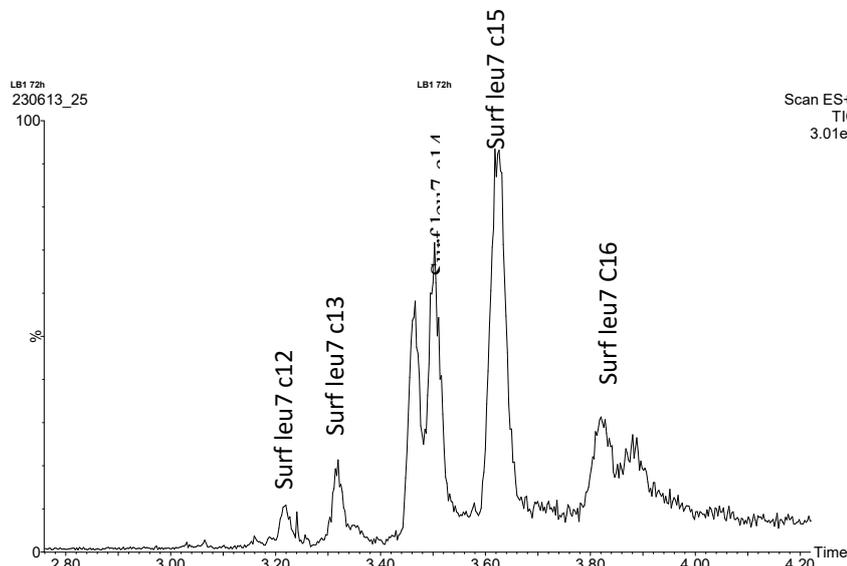


Figure 39 Chromatogrammes correspondant aux surfactines produits par *B. halotolerans* sur milieu LB analysés par UPLC/MS.

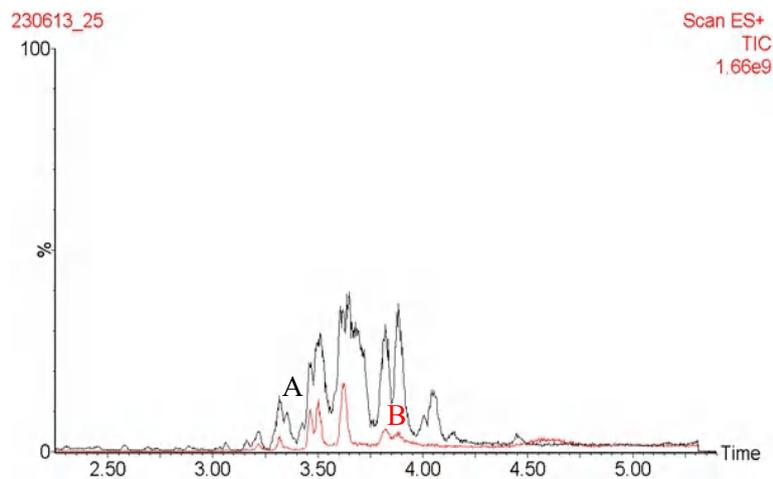


Figure 40 Superposition des chromatogrammes correspondant aux surfactines produits par *B. halotolerans* ; (A) : sur milieu MA (Avoine comme seule source de carbone), (B) : sur milieu LB analysé par UPLC/MS.

RESULTATS

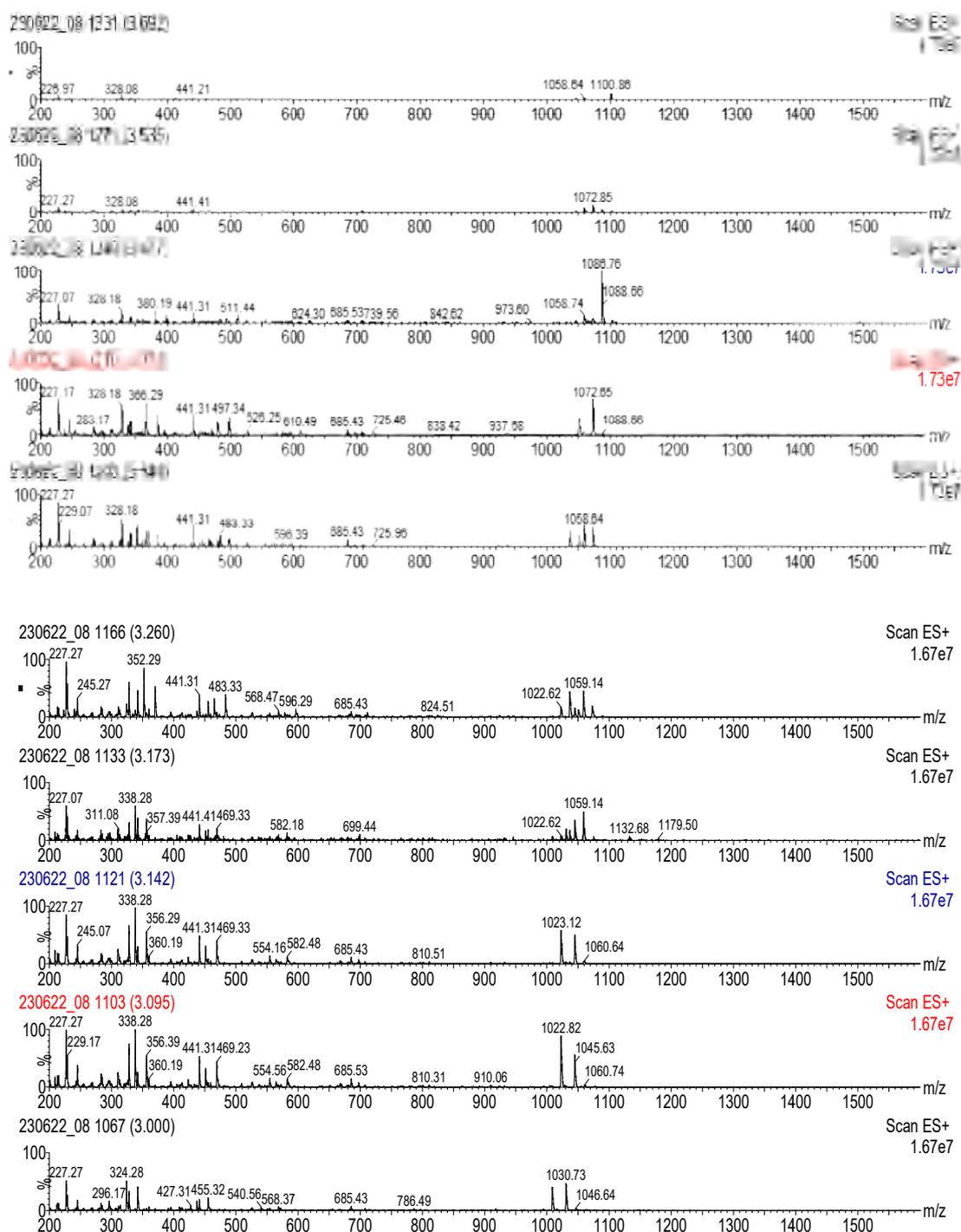


Figure 41 Spectres de masse des analoges de surfactine identifiés dans le surnageant de *B. halotolerans* à l'aide de UPLC-MS.

4.12- Activité PGPR

Les résultats des tests obtenus *in vivo*, ont montré que *B. halotolerans* confère une amélioration de croissance et une protection aux plants de tomates contre le phytopathogène *F. napiforme*, ce qui a motivé notre intérêt à tester la capacité de *B. halotolerans* à produire certaines molécules caractéristiques d'effets PGPR *in vitro*. *B. halotolerans* a pu se développer sur milieu WS solide, ce qui démontre sa capacité à fixer l'azote. La dégradation de l'amidon a été mise en évidence par l'apparition d'une zone claire autour de la colonie, après avoir inondé la gélose avec la solution de Lugol ; l'indice enzymatique était égal à 2,51. La dégradation de la caséine a été confirmée avec un indice enzymatique égal à 1,40. La présence d'H₂CN a été reflétée par l'apparition d'une couleur orange à rouge dont l'intensité varie en fonction de sa dose. Par ailleurs, la production d'ammoniac par *B. halotolerans* est mise en évidence par l'apparition d'une couleur jaune après ajout du réactif de Nessler. La production d'acide indole-3-acétique est mise en évidence par un changement de couleur après ajout du réactif de Salkowski. Enfin, la production de sidérophores est mise en évidence par un changement de couleur du milieu (bleu à orange), ainsi que par l'apparition de halos autour des colonies. Aussi, *B. halotolerans* a montré sa capacité à produire des biosurfactants après 48 h d'incubation, ce qui s'est traduit par l'apparition de zones claires autour des colonies, sur un milieu à base de gélose au sang (Figure 42).

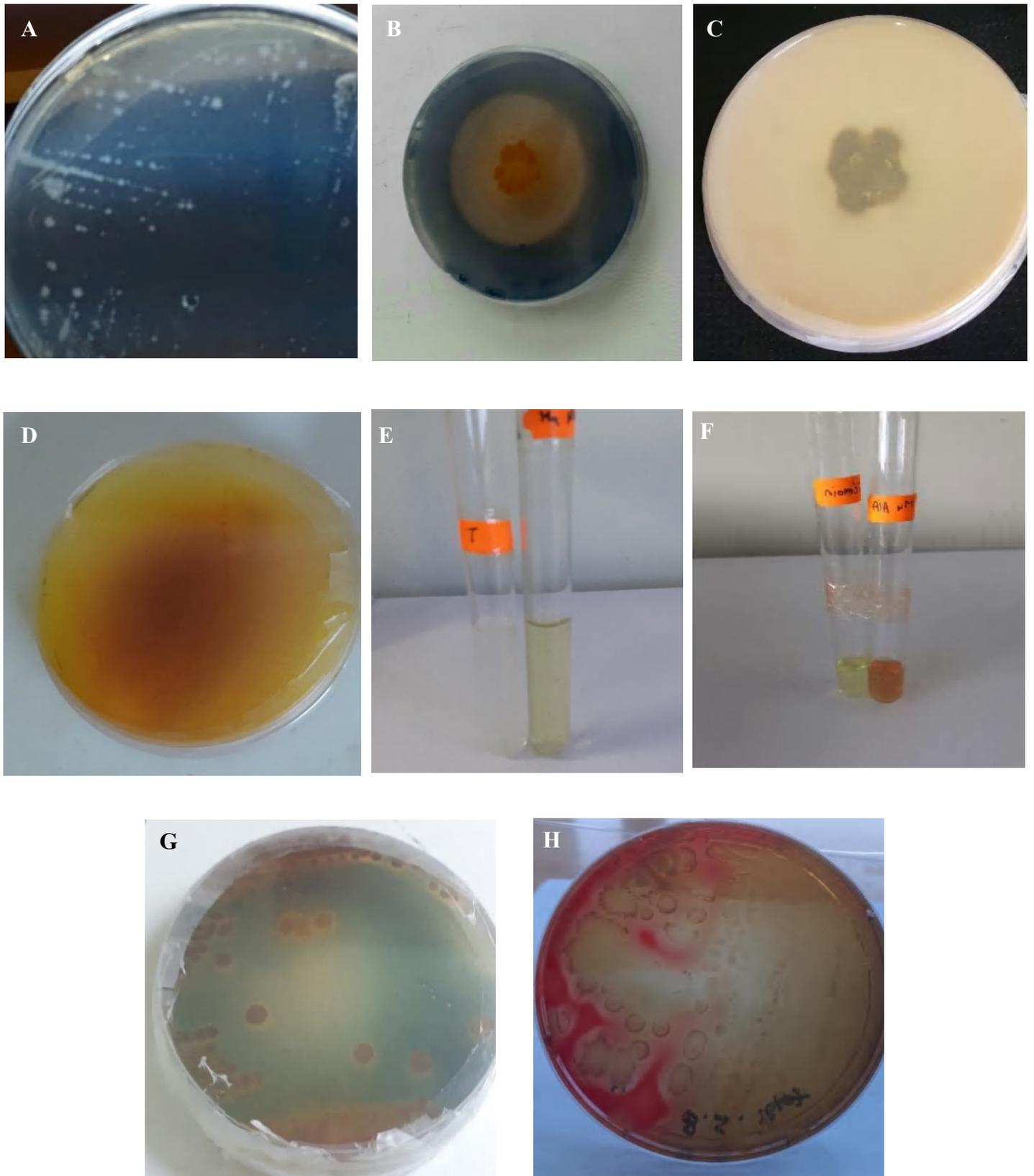


Figure 42 Activité PGPR par *B. halotolerans* : **A**, fixation d'azote ; **B**, production d'amylase ; **C**, production de caséinase ; **D**, production de HCN ; **E**, production de NH_3 ; **F**, production de l'IAA ; **G**, production des siderophores ; **H**, production de biosurfactant.

Discussion

5- Discussion

La biomasse ligno-cellulosique est un substrat renouvelable et abondant. Cependant, en raison de sa structure et de sa composition macromoléculaire complexe, il nécessite plusieurs types de prétraitements (Reyes *et al.*, 2013 ; Jonsson *et al.*, 2016). Le prétraitement biologique de la biomasse ligno-cellulosique utilise le pouvoir de certains micro-organismes comme agent biocatalysant pour rendre cette matière plus facile à traiter et à digérer (Vasco-Correa *et al.*, 2016). Sur un autre volet, les maladies des plantes peuvent avoir un impact significatif sur la productivité agricole, réduisant les rendements de 21 à 30 % dans plusieurs cultures majeures à travers le monde (Savary *et al.*, 2019). Parallèlement, certains agents pathogènes des plantes ont développé une résistance aux pesticides chimiques (Lucas, 2011), contribuant ainsi à la propagation de maladies. De plus, les difficultés de décomposition des insecticides en composants moins dangereux entraînent la persistance de résidus toxiques dans le sol, posant ainsi des risques pour la santé (Gilden *et al.*, 2010). L'agriculture moderne s'est tournée vers les microorganismes comme alternative aux pesticides chimiques, ces derniers sont efficaces et sûrs pour l'environnement. Le bio-contrôle offre ainsi l'une des stratégies les plus économiques et efficaces à long terme, pour gérer les maladies des plantes et réduire les pertes agricoles (El saadony *et al.*, 2020).

C'est dans ce contexte que s'inscrit ce présent travail, et qui vise l'isolement et l'identification des microorganismes présents dans le sol autour de l'arbre de pin situé à l'Est de l'Algérie (Constantine). Cette démarche a pour but d'utiliser ces microorganismes d'une part, comme agents de dégradation de la biomasse ligno-cellulosique et d'autre part, comme agents de biocontrôle pour protéger les récoltes et améliorer le rendement agricole tout en préservant l'environnement, la santé humaine et animale.

En effet, dans cette étude, soixante-douze isolats microbiens ont été obtenus à partir des différents échantillons utilisés. Parmi les isolats obtenus, seules une bactérie et une moisissure ont été sélectionnées en tant qu'agent de dégradation de la biomasse ligno-cellulosique (cellulose, hémicellulose et lignine). La capacité des isolats sélectionnés à dégrader la cellulose, a été effectuée en utilisant le CMC comme substrat inducteur. Sa réaction positive avec du rouge Congo a laissé apparaître une zone claire autour des colonies bactérienne et fongique signifiant la présence de l'enzyme cellulase sécrétée par les cellules de la souche testée (Pointing *et al.*, 1999). Les résultats obtenus sont similaires à ceux obtenus par Akhtar *et al.*, (2012) ; Abu-Gharbia *et al.*, (2018) ; Raza *et al.*, (2019), qui ont observé que les

bactéries et les moisissures du genre *Bacillus* et *Chaetomium* respectivement présentaient une activité cellulolytique.

L'activité xylanase est révélée par la coloration du milieu synthétique à base du xylane, préalablement ensemencé par l'isolat bactérien M4 et l'isolat fongique P2L, par le Rouge Congo. Le résultat obtenu a permis d'observer une zone claire autour des colonies. Ce halo transparent représente une zone de dégradation du xylane et donc une production de xylanase. Ces résultats sont en adéquation avec ceux de Rattu *et al.*, (2016) et Abu-Gharbia *et al.*, (2018) lorsque ils testent la même activité en utilisant le même colorant. En plus de leur capacité à dégrader la cellulose et l'hémicellulose, les isolats M4 et P2L ont également montré leur aptitude à dégrader la lignine. Ces résultats rejoignent ceux de Margo *et al.* (2013) ; Mtibaa *et al.*, 2017 ; Yasar *et al.*(2018), qui ont étudié la dégradation de la lignine par différentes souches bactériennes et fongiques. Il est important de noter que selon la littérature, plusieurs microorganismes sont impliqués dans la dégradation de la matière lignocellulosique en produisant les trois types d'enzymes en même temps (Gilbert et Harlewood, 1993; Vasco-Correa *et al.*, 2016). Ce point révèle l'importance de nos souches isolées et sélectionnées. En effet, l'isolat bactérien M4 et l'isolat fongique P2L sont capables de dégrader tous les constituants du déchet lignocellulosique en produisant les enzymes responsables en l'occurrence cellulase, hemicellulase et xylanase simultanément.

L'observation macroscopique de l'isolat Alt, après 7 jours de croissance sur milieu PDA, a mis en évidence une colonie de teinte claire, tirant vers l'olivâtre verdâtre, présentant une texture duveteuse, avec une face inférieure de couleur grise, et enfin des bordures mycéliennes régulières. L'observation microscopique de l'isolat Alt sous microscope optique (X40) a révélé la présence d'hyphes septés de couleur brune, de spores allongées, de conidies en chaînes sur des conidiophores. Les caractères macroscopiques et microscopique mentionnés ci-dessus sont en accord avec ceux décrits par Woodenberg *et al.*, 2013 ; Lawrence *et al.*, 2013. Cette étude morphologique de l'isolat Alt a présenté les caractéristiques typiques du genre *Alternaria* (Gauthier, 2016).

L'examen macroscopique de l'isolat F1 à 30°C sur milieu gélosé, a révélé des colonies plates avec une croissance rapide. La texture des colonies est cotonneuse. Le revers des colonies est de couleur rose à saumon et les bordures des colonies sont régulières. L'examen microscopique de l'isolat F1 a été effectué à l'aide d'un microscope à fluorescence au grossissement (X60), cet examen a révélé la présence d'hyphes septés. Ces hyphes peuvent être observés sous forme de filaments ramifiés qui forment un réseau appelé mycélium formé

de conidiophores, qui sont responsables de la formation et de la dispersion des spores et de chlamydo-spores, qui sont des structures de survie épaissies et résistantes. Ces chlamydo-spores peuvent être observés comme des structures rondes ou ovales plus épaisses que les conidies. Ces observations sont en adéquation avec celles faites par Santos *et al.* (2017) et Summerell, (2019), qui ont montré que ces caractéristiques ont permis de se rapprocher du genre *Fusarium*. La caractérisation moléculaire des isolats Alt et F1 a confirmé l'identification préliminaire. En effet, après avoir comparé les séquences ADN des deux isolats aux séquences de référence précédemment déposées sur GenBank, les deux souches fongiques se sont révélées être *Alternaria alternata* (ON714501) et *Fusarium napiforme* (ON204349).

Les résultats du test d'antagonisme *in vitro* des deux isolats bactériens et fongiques, M4 et P2L respectivement, vis-à-vis d'*A. alternata* et *F. napiforme* ont montré un effet inhibiteur intéressant. En effet, une inhibition de la croissance des mycéliums *F. napiforme* et d'*A. alternata* a été observée, avec 72 % et 64 % pour l'isolat bactérien M4 vis-à-vis des phytopathogènes *F. napiforme* et *A. alternata* respectivement. Pour l'isolat fongique P2L, les taux d'inhibition étaient égaux à 35,4 % et 52,3 % vis-à-vis des phytopathogènes *F. napiforme* et *A. alternata* respectivement. Cette activité inhibitrice est le résultat de plusieurs travaux publiés dans la littérature, qui ont montré la production de composés antifongiques et/ou de métabolites sur le milieu PDA (Dihazi *et al.*, 2012). Ces résultats rejoignent les travaux de Pandey *et al.* (2021), Yu *et al.* (2021), Harman *et al.* (2020) et Gauthier *et al.* (2022) qui ont montré la capacité des souches bactériennes et fongiques à développer une activité anti-*Fusarium* et *Alternaria*. L'identification macroscopique de l'isolat M4 a montré des colonies rondes, d'un diamètre variant entre 1 et 2 mm, de couleur blanchâtre. L'observation microscopique et la coloration de Gram ont révélé que cet isolat est un bacille Gram+. De plus, un test de sporulation ainsi qu'un test de catalase ont été réalisés, ces derniers ayant été positifs, ce qui a confirmé que l'isolat M4 appartient au genre *Bacillus*.

L'identification macroscopique de l'isolat P2L nous a permis d'observer des colonies de couleur blanche à grise, d'une texture cotonneuse, devenant brunâtres avec l'âge. On a également observé des ascomas, des structures en forme de coussinets ou de globes, souvent situées à la surface des colonies ou enfoncées dans le substrat sur lequel le champignon se développe.

Les observations microscopiques à un grossissement de X40 ont été réalisées en utilisant la méthode du ruban adhésif et celle du lactophénol-bleu de coton. Le thalle est composé d'hyphes septés, bien que leur séparation soit difficile en raison de la structure dense

caractéristique de ce type de champignon. En ce qui concerne la sporogenèse, les ascospores apparaissent comme des cellules uniques et elliptiques ressemblant à des citrons, correspondant à celles décrites dans la littérature (Dupuy *et al.*, 2012).

L'identification moléculaire de l'isolat M4 a montré qu'il s'agit de *Bacillus halotolerans* (ON204239). Ce qui rejoint les résultats de l'étude de Wu *et al.*, (2020) où *B. halotolerans* a été isolé à partir d'un environnement spécifique.

En ce qui concerne l'identification moléculaire de l'isolat P2L, celle-ci a révélé que P2L est *Chaetomium strumarium*. Cependant, ce dernier a été exclu du reste de l'étude en raison de son pouvoir pathogène pour l'Homme. En effet, plusieurs études ont rapporté des cas d'infections cutanées et d'onychomycoses causées par *C. strumarium*. De plus, cette espèce est également responsable d'abcès cérébraux chez les humains immunodéprimés (Aribandi *et al.*, 2003 ; Plumlee *et al.*, 2017). Les résultats de l'analyse pédologique du sol autour de l'arbre du pin (Forêt d'El Baaraouia) ont montré que ce sol est caractérisé par un pH légèrement alcalin de 8,17. En effet, cela peut avoir diverses implications sur la fertilité du sol et la disponibilité des nutriments pour les plantes. Par exemple, un pH élevé peut entraîner une disponibilité réduite de certains nutriments essentiels comme le fer, le zinc et le cuivre, tout en favorisant la disponibilité de certains autres éléments comme le phosphore. Cela peut avoir des implications importantes pour la croissance des plantes dans cette région (Zhang *et al.*, 2019). Une conductivité électrique de 1,6 mS/cm, suggérant une salinité relativement élevée (Gupta *et al.*, 2020). La saturation de 50 % a indiqué une teneur en humidité modérée. Zhou *et al.* (2021) ont montré qu'une teneur en humidité modérée, peut être bénéfique pour la croissance des plantes en fournissant un environnement favorable pour l'absorption des nutriments et le développement des racines. La présence d'ions carbonate (97,60 mg/L), sulfate (255,84 mg/L), chlorure (189,21 mg/L), calcium (144,60 mg/L), et magnésium (22,80 mg/L) a montré des valeurs élevées, ce qui peut influencer la fertilité du sol. D'après Ma *et al.*, 2022, des concentrations élevées d'ions carbonate, de sulfate, de chlorure, de calcium et de magnésium peuvent avoir une influence sur la fertilité du sol et la disponibilité des nutriments pour les plantes. Les concentrations en ions sodium (52,44 mg/L) et potassium (3,19 mg/L) ont suggéré des niveaux modérés à faibles, ce qui montre la pauvreté de ces éléments nutritifs dans le sol (Ahmed *et al.*, 2020). Ces résultats ont montré que la région d'échantillonnage a, généralement, présenté une certaine adaptation à des conditions environnementales spécifiques relativement aux sols fertiles, et peut être considérée comme un milieu partiellement inhabituel.

L'étude de la physiologie et la caractérisation de la souche bactérienne sélectionnée sous différentes conditions de pH, de salinité et de température a été développée dans la présente étude. En effet, la courbe de croissance de *B. halotolerans* en fonction du temps a révélé une courte phase de latence, cela correspond à l'adaptation des cellules au milieu de culture, où elles ajustent leur métabolisme pour utiliser les nutriments disponibles. Des études récentes, comme celles de Shah *et al.* (2023) sur *B. halotolerans*, ont également observé des phases de latence courtes, soulignant la capacité d'adaptation rapide de ces bactéries à de nouveaux environnements. Une accélération très rapide de la croissance cellulaire correspondant à la phase exponentielle a été remarquée, elle est caractérisée par une multiplication cellulaire rapide qui est souvent associée à une utilisation optimale des ressources disponibles dans le milieu de culture. Chen *et al.* (2022) ont montré que cette phase peut varier en fonction des facteurs environnementaux tels que la disponibilité des nutriments et la température. Cette croissance exponentielle est suivie d'une phase stationnaire, où la croissance ralentit et atteint un plateau, reflétant un équilibre entre la multiplication et la mort cellulaires. Les bactéries peuvent entrer dans cette phase en raison de l'épuisement des ressources ou de l'accumulation de produits métaboliques toxiques (Li *et al.*, 2024). Enfin, une phase de déclin a été observée qui signifie que les conditions deviennent extrêmement défavorables, entraînant la mortalité cellulaire. Gomez *et al.*, (2023), ont montré que les conditions de stress environnementaux peuvent induire des réponses physiologiques et génétiques provoquant la mortalité cellulaires microbiennes.

La capacité de *B. halotolerans* à croître à différentes températures, à différentes concentrations de NaCl et à différentes valeurs de pH a été évaluée. Les résultats obtenus ont montré que *B. halotolerans* est capable de se développer à des températures supérieures à 50 °C, dans un pH de 4 à 11 et de résister à des concentrations de NaCl allant jusqu'à 100 g/L. Ces caractéristiques mettant en lumière les capacités adaptatives exceptionnelles de *B. halotolerans*, ce qui ouvre la voie à de nouvelles opportunités pour son utilisation dans diverses applications biotechnologiques tels que la bioremédiation, la production industrielle et la recherche pharmaceutique (El Hassni *et al.*, 2007 ; Dihazi *et al.*, 2012 ; Jiang *et al.*, 2017 ; Seydehm *et al.*, 2018 ; Ben Slama *et al.*, 2019).

Les résultats de l'activité antagoniste de surnageants du *B. halotolerans in vitro* ont montré l'influence du milieu de fermentation utilisé (MA et/ou LB). En effet, le meilleur effet antifongique, contre *F. napiforme* (ON204349) a été enregistré dans le cas des disques

imprégnés par le surnageant du milieu de culture (MA) avec des diamètres de 16 mm après 24h.

Les espèces de *Bacillus* sont réputées pour leurs capacités antifongiques significatives, caractérisées par la production d'une gamme de métabolites puissants et d'enzymes hydrolytiques, comme il a été observé dans l'étude de Rahman *et al.*, en 2007.

Au sein de ce genre, de nombreuses espèces bactériennes ont été identifiées comme productrices de substances bioactifs (Ongera *et al.*, 2005). Les taux d'inhibition élevés peuvent être attribués à une densité cellulaire plus élevée ou à la présence d'un plus grand nombre de métabolites secondaires antifongiques (Zhu *et al.*, 2020). Les résultats obtenus sont également similaires à ceux qui ont été rapportés par Diabankana *et al.* (2021) où la souche *B. mojavensis* (PS17) a démontré une forte inhibition contre *Fusarium sp.*

Dans ce travail, l'utilisation conjointe du modèle de Box-Behnken (BBD) et de la méthode des surfaces de réponse (RSM) ont été employées pour déterminer les conditions optimales permettant d'optimiser l'activité antagoniste du surnageant de culture de *B. halotolerans* contre *F. napiforme* (ON204349). Les conditions optimales identifiées étaient une concentration en substrat de 7 g/L, un temps d'incubation de 30 heures, un pH de 3,4 et une température de 37,4°C. Sous ces conditions optimales, une zone d'inhibition significative de 18 mm a été observée après 24 heures d'incubation sur le diagramme de la surface de réponse qui illustre les impacts proportionnels de deux paramètres indépendants tout en gardant les deux autres variables fixées à leurs niveaux moyens respectifs. Ces résultats démontrent l'efficacité du modèle utilisé pour optimiser l'activité antagoniste *in vitro* de *B. halotolerans* contre *F. napiforme*. Étant donné que le diamètre de l'activité antagoniste avant optimisation était égal à 16 mm. Parallèlement, une autre approche a été explorée en utilisant le modèle des réseaux de neurones artificiels (ANNs) associé à un algorithme génétique (GA) pour optimiser au mieux, l'effet antagoniste. Les conditions optimales résultantes étaient similaires en termes de concentration en substrat, de température et de temps d'incubation, soit 7 g/L, 37,4°C et 30 heures respectivement, mais différaient au niveau du pH, qui était de 2,31. L'application de ces conditions, a permis d'obtenir une zone d'inhibition encore plus importante, mesurant 18,5 mm après 24 heures. Ces valeurs ont confirmé la validité du test, car les résultats prédits par ce modèle dans ces conditions optimisées pour l'activité antagoniste de *B. halotolerans* étaient 19,21mm. Par conséquent, cette valeur est proche de la valeur réelle obtenue expérimentalement (18,5 mm).

D'autres études ont utilisé le modèle BBD-RSM pour optimiser l'activité antagoniste comme celle de Zhang *et al.* (2019) qui ont utilisé le modèle de BBD-RSM pour optimiser les conditions de culture de *Bacillus velezensis* ZX01 afin d'améliorer sa capacité antagoniste contre *Botrytis cinerea*. Les conditions optimales identifiées étaient également basées sur des paramètres tels que la concentration en substrat, le temps d'incubation et le pH. Cette étude a également montré une amélioration significative de l'activité antagoniste une fois les conditions optimales appliquées. Chen *et al.* (2018) ont également utilisé une approche conjointe du modèle de Box-Behnken (BBD) et de la méthode des surfaces de réponse (RSM) pour optimiser les conditions de culture de *Pseudomonas aeruginosa* JB01 afin d'améliorer son activité antagoniste contre *Fusarium oxysporum*. Les conditions optimales déterminées ont conduit à une augmentation significative de l'activité antagoniste.

Dans une autre étude, Li *et al.*, (2020) ont adopté une approche différente en utilisant le modèle des réseaux de neurones artificiels (ANNs) pour optimiser la production de métabolites bioactifs par *Bacillus subtilis* X1. Leur méthode impliquait l'utilisation d'un modèle combinant des ANNs avec un algorithme génétique (GA) pour ajuster les paramètres de culture tels que la concentration en substrat, le temps d'incubation et le pH. Les résultats obtenus ont révélé une amélioration significative de la production de métabolites par rapport aux conditions de départ. Les résultats de cette étude rejoignent ceux obtenus dans le présent travail, à savoir optimiser au mieux l'activité antagoniste de *B. halotolerans* vis-à-vis de *F. napiforme*.

Les résultats du test de pathogénicité réalisé sur des plants de tomate infectés par *F. napiforme* et *A. alternata* ont révélé que les agents phytopathogènes sont responsables des maladies causées par *Fusarium* et *Alternaria*. La présence de ces champignons pathogènes infectant les plants de tomate a été signalée par plusieurs études, (Fatih *et al.*, 2005 ; Leslie and Summerell, 2006 ; AbdAllaet *al.*, 2014 ;Kokaevaet *al.*, 2015 ; Milet, 2017 ;Debbiet *al.*, 2018). Les plants de tomates traités par *F. napiforme* ont développé des symptômes tels qu'un jaunissement et un flétrissement lors des deux premières semaines d'incubation. A la troisième semaine d'incubation, nous avons observé la mort des plants de tomates, et le degré de sévérité de la maladie a atteint le 88,9%, ce qui montre que *F. napiforme* a un pouvoir pathogène important. Ces résultats sont en accord avec ceux de Debbi *et al.*, (2018) qui ont montré que les plants de tomates infectés par des isolats de *Fusarium* présentaient des symptômes typiques de la fusariose. En parallèle, les plants de tomates traités par *A. alternata*

ont développé principalement au niveau des feuilles, des taches circulaires de couleur brune. Au fil du temps, les feuilles atteintes par l'alternariose jaunissent et commencent à tomber. Nous avons également remarqué que la maladie de l'alternariose se développe lentement lors des premiers jours d'incubation, mais accélère lorsque le temps d'incubation augmente. Le degré de sévérité calculé est compris entre 11 et 25%. D'autres études ont présenté des résultats quasi-similaires (Stammler *et al.*, 2014 ; Milet, 2017 ; Habib *et al.*, 2021).

Dans le présent travail, des effets positifs significatifs sur la croissance et la protection des plantes de tomate contre *F. napiforme* ont été enregistrés en conditions de pots et en pleins champs, avec un meilleur effet observé dans le cas des lots traité avec *B. halotolerans* préalablement inoculé sur le milieu MA en comparaison avec le milieu LB. Ces résultats sont conformes avec ceux de Ajilogba *et al.*, 2013 qui ont montré que les plants de tomates traités avec *Bacillus sp* étaient protégés à 75% de la maladie générée par *Fusarium* en comparaison avec le témoin. Plusieurs travaux publiés dans la littérature concernant la production d'antibiotiques et d'autres molécules bioactives par le genre *Bacillus spp* (Ferdous *et al.*, 2018 ; Mijlakovic *et al.*, 2020) qui jouent un rôle important dans la protection des plantes puisque ces souches bactériennes peuvent synthétiser une série de métabolites antifongiques. Il s'agit notamment de lipopeptides (LP) qui comprennent les familles, des surfactines, des iturines et des fengycines (Milet, 2017 ; Aït kaki *et al.*, 2020 ; Kang, R.B. *et al.*, 2020).

Cependant, aucune étude, d'après la littérature, n'a concerné la production de métabolites bioactives sur milieu à base de paille d'avoine comme seule source de carbone et d'azote.

Des études antérieures ont montré que *Bacillus spp* a réduit de manière significative l'incidence de diverses maladies grâce à plusieurs mécanismes (Kloepper *et al.*, 2007). En effet, les espèces du genre *Bacillus* renforcent la capacité de défense de la plante contre un large spectre de champignons, de bactéries et de virus ; ce phénomène est connu sous le nom de Résistance Systémique Induite (RSI) (Penha *et al.*, 2020). Le mécanisme de défense peut être activé de la même manière que la réponse contre les microorganismes pathogènes avec des interactions incompatibles (García-Gutiérrez *et al.*, 2013). La résistance systémique induite est souvent représentée par des voies de signalisation dépendant de l'acide jasmonique/éthylène (JA/ET) (Penha *et al.*, 2020). Selon Rahman *et al.* (2015), bien que la résistance systémique induite soit généralement indépendante de l'acide salicylique (SA),

certaines rhizobactéries peuvent déclencher la voie de signalisation dépendante de l'acide salicylique. Les LPs cycliques sont des contributeurs clés à l'activité déclencheuse de la RSI (Rahman *et al.*, 2015). Les mécanismes déclenchés par la RSI sont liés à des changements biochimiques, notamment le renforcement des parois cellulaires des plantes, la production de phytoalexines antimicrobiennes et la synthèse de protéines liées à la pathogenèse (PR), telles que les chitinases, les β -1,3-glucanases ou les peroxydases (García-Gutiérrez *et al.*, 2013). La protection conférée par *Bacillus spp* peut être basée sur la production de métabolites secondaires (des antibiotiques, des composés volatiles et non volatiles) en colonisant la surface des racines, causant ainsi l'inhibition du mycélium fongique et de ce fait améliorer la croissance des plants. (Jangaa *et al.*, 2017). De plus, les bactéries du genre *Bacillus* peuvent survivre sous forme d'endospores pendant de longues périodes dans des conditions environnementales difficiles. Des études ont montré que la tolérance au stress chez les plantes augmente grâce à la présence des espèces du genre *Bacillus* (Radhakrishnan *et al.*, 2017).

Dans notre étude, nous avons utilisé la technique de la double culture afin de tester l'effet antagoniste de *B. halotolerans* vis-à-vis de *F. napiforme*. La technique de microscopie à fluorescence considérée comme l'une des techniques microscopiques les plus importantes (Kubitscheck *et al.*, 2017), nous a permis une visualisation efficace des microorganismes (Molinari *et al.*, 2015). Le SYTO 9 est un colorant fluorescent d'acide nucléique largement utilisé en microbiologie, en particulier pour les analyses par microscopie à fluorescence et cytométrie de flux (Mc Govern *et al.*, 2020). Le SYTO 9 est excité par le bleu (maximum d'excitation de 485 nm) et fluorescent par le vert (maximum d'émission de l'ADN de 498 nm et de l'ARN de 501 nm), il est perméable aux cellules. Ce colorant a donc été utilisé en microscopie à fluorescence (Larrosa *et al.*, 2012 ; Zotta *et al.*, 2012 ; Tawakoli *et al.*, 2013 ; Bogachev *et al.*, 2018), en cytométrie en flux (Lehtinen *et al.*, 2004 ; Soejima *et al.*, 2009 ; Larrosa *et al.*, 2012) et dans des études de fluorimétrie (Pascaud *et al.*, 2009 ; Larrosa *et al.*, 2012). Il se lie à l'acide nucléique, ce qui signifie que la quantité d'acide nucléique présente dans la cellule influe sur la quantité de SYTO 9 et par conséquent, sur l'intensité de la fluorescence. Par ailleurs, l'Evan bleu est un colorant d'exclusion acide, qui colore les cellules mortes ou endommagées (Preethi *et al.*, 2020). Le colorant ne pénètre pas dans les cellules vivantes dont les membranes sont stables (Gaff et Okong'O-Ogala, 1971). L'observation microscopique à fluorescence en utilisant le SYTO 9 et l'Evan bleu comme colorants, nous a permis un changement morphologique important dans les conidies et des distorsions substantielles dans les hyphes de *F. napiforme* causés par *B. halotolerans*. On suppose que *B.*

halotolerans provoque soit une fuite, soit une désactivation du contenu cellulaire ou une vacuolisation.

Nous avons également noté une inhibition de la formation et de la croissance des hyphes. Ces résultats sont en parfait accord avec ceux de Vitullo *et al.*, (2012) qui ont utilisé la microscopie à fluorescence pour observer l'interaction entre *B. amyloliquefaciens* (BO7) et *F. oxysporom f. sp. Lycopersici* (Fol). Le Dichlorhydrate de Diamidino-4', 6-phényindole-2 (DAPI) a été utilisé comme colorant dans leur étude.

Dans ce travail nous nous sommes intéressés à la production de lipopeptides sécrétés par la souche *B. halotolerans* sur les deux milieux cités auparavant, notamment les biosurfactants, les fengycines et les iturines.

Les résultats obtenus ont montré que *B. halotolerans* a produit des surfactines et des iturines lorsqu'il était cultivé sur milieu MA, alors que sur milieu LB, il n'a produit que des surfactines. Il est à préciser qu'aucune trace de fengycines n'a été détectée sur les deux milieux de culture

Les micro-organismes producteurs de biosurfactants améliorent la croissance des plantes grâce à l'amélioration de leur immunité contre les contaminants organiques présents dans l'environnement. En outre, ils sont également efficaces pour atténuer les réponses au stress chez les plantes tout en renforçant la croissance et le développement des plantes (Almansoori *et al.*, 2019). La surfactine de préférence et, dans une moindre mesure, la fengycine, sont des lipopeptides qui sont capables de provoquer des réponses de défense et qui génèrent des molécules de signalisation pour l'activation de la résistance systémique induite (ISR) chez les plantes (Ongena *et al.*, 2007). L'une des conséquences positives de l'utilisation des lipopeptides en agriculture est leur biocompatibilité avec les organismes vivants (Ławniczak *et al.*, 2013). Dans le domaine de l'agriculture moderne, l'utilisation de biosurfactants bactériens joue un rôle important car ils sont écologiques et abordables (Hafeez *et al.*, 2019 ; Muthusamy *et al.*, 2008).

Dans la présente étude, l'identification des surfactines par UPLC-MS dans les surnageants de culture des différents milieux MA et LB, a montré que *B. halotolerans* a la capacité de produire des surfactines avec sept analogues (C12, C13, C14, C15, C16, C17 et C18) en quantités significatives sur le milieu MA avec une proportion plus élevée des homologues C15 et C16 en comparaison avec les autres analogues produits. Sur le milieu LB, la

production des surfactines a également été observée, mais moins que sur le milieu MA, avec seulement cinq analogues (C12, C13, C14, C15 et C16) avec une proportion plus élevée de C15 que les autres analogues produits. Ces résultats concordent avec ceux obtenus par (Biniarz *et al.*, 2017 et Janek *et al.*, 2020, 2021) qui ont montré que les bactéries du genre *Bacillus* ont la capacité de produire des surfactines. Ces résultats rejoignent également ceux de (Polina *et al.*, 2022) qui ont démontré la capacité de *B. halotolerans* à produire des homologues de surfactines. Les résultats obtenus dans cette étude sont également cohérents avec ceux d'autres études notamment celles de (Battal *et al.*, 2023) qui ont testé la capacité de plusieurs espèces du genre *Bacillus* à produire des surfactines. Ceux-ci ont montré une très bonne production de différents homologues de surfactines jusqu'au C18. En effet, le milieu de culture peut influencer la proportion des homologues de surfactine avec différents fragments d'acyle. Nos résultats corroborent, à titre d'exemple, ceux de Liu *et al.* (2015) qui ont constaté que la souche *B. subtilis* BS-37 produit des homologues de surfactine plus faibles avec des proportions plus élevées de surfactine C15 lorsqu'elle est cultivée dans un milieu LB par rapport à un milieu glucosé.

Comme déjà signalé dans la partie précédente, c'est la première fois, à notre connaissance, que la production de surfactine par *B. halotolerans* sur un milieu à base d'avoine, comme seule source de carbone, est mise en évidence.

Dans cette étude, la souche sélectionnée *B. halotolerans* a montré sa capacité à produire des molécules à effet PGPR en l'occurrence : la fixation d'azote, la production d'amylase, la production de protéase, la production du HCN, la production du NH₃, la production de l'AIA, et la production de sidérophores.

Certains microorganismes présentent un effet PGPR qui favorisent la croissance des plantes grâce à divers mécanismes directs et indirects (Vacheron *et al.*, 2013). Plusieurs espèces microbiennes sont mentionnées comme PGPR (Goswami *et al.*, 2016 ; Fan *et al.*, 2018). Les mécanismes directs par exemple peuvent fournir des nutriments (azote, phosphore, potassium et minéraux) ou à réguler les niveaux d'hormones végétales (Figueiredo *et al.*, 2016). Les mécanismes indirects englobent les effets inhibiteurs sur divers pathogènes végétaux grâce à des substances antagonistes produites par ces microorganismes, ou en induisant la résistance aux pathogènes végétaux chez la plante. De plus, certains microorganismes produisent des endospores qui les rendent résistants à des conditions environnementales sévères, ce qui en fait un bon choix d'agents de bio-contrôle (Miljakovic *et al.*, 2018).

De nombreuses recherches ont vérifié que les rhizobactéries favorisant la croissance des plantes (PGPR), améliorent positivement le développement des plantes après association avec les bactéries dégradant les hydrocarbures dans le sol contaminé (Pawlik *et al.*, 2017).

En effet, la fixation d'azote par les rhizobactéries est importante pour un système agricole durable, car les plantes dépendent principalement du processus de fixation d'azote par les bactéries vivantes dans la rhizosphère grâce à la nitrate réductase (Mia *et al.*, 2005 ; Martinez-Viveros *et al.*, 2010).

De plus, plusieurs enzymes lyolitiques produites par les souches bactériennes, sont commercialement importantes et hydrolysent sélectivement des substrats complexe en sucres simples plus petits ce qui leur permet d'être facilement utilisés pour la production d'ATP (Meghatiet *et al.*, 2017 ; Noor El Hussein *et al.*, 2020).

Les travaux effectués par Castaldi *et al.* (2021) ont montré que 50% des *Bacillus* isolés de la rhizosphère du sol ont une activité enzymatique lytique.

La production de substances inhibitrices volatiles peut augmenter le taux de survie des bactéries dans le sol, en éliminant les concurrents potentiels pour les nutriments (McNeill et Unkovich, 2007). Elles ont des effets antibiotiques, et jouent un rôle dans la protection de la plante hôte. Parmi ces substances, on peut citer le cyanure d'hydrogène (HCN). Le HCN est un composé antimicrobien à large spectre, impliqué dans le contrôle biologique des maladies des racines (Ramette *et al.*, 2003). La production de HCN par notre souche de *B. halotolerans* de cyanure d'hydrogène rejoint les résultats de Dheeman *et al.* (2020) qui ont observé que 59,6% des *Bacillus* isolés du sol, étaient producteurs de HCN.

La production de l'ammoniac comme intermédiaire du catabolisme des acides aminés racinaire assimilés par les bactéries, est un agent inhibiteur des phytopathogènes. Plusieurs travaux ont montré la capacité des souches bactériennes à produire le NH₃ (Howell *et al.*, 1988 ; Joseph *et al.*, 2007 ; Ahmed *et al.*, 2008). En effet, Dans le but de stimuler et de promouvoir la croissance des plantes, les bactéries rhizosphériques ont la capacité de produire des métabolites tels que l'acide indole acétique (Vejan *et al.*, 2016). Plusieurs études ont montré la capacité des bactéries rhizosphériques à produire cet acide. Parmi ces études, celle effectuée par Dheeman *et al.*(2020) qui a montré que 70% des *Bacillus* avaient la capacité à produire l'AIA.

Les sidérophores sont des peptides non ribosomiques, chélateurs de métaux, produits par certains microorganismes et plantes, en particulier dans des conditions de carences en fer (Khan *et al.*, 2017). Le rôle principal des sidérophores est de rendre accessible le fer permettant ainsi sa solubilisation et son extraction des minéraux et des composés organiques. L'importance des sidérophores dans la lutte biologique est basée sur la réduction de la concentration du fer pour les phytopathogènes. (Beneduzi *et al.*, 2012). La production de sidérophores par des souches bactérienne, ont fait l'objet de plusieurs travaux dont ceux réalisés par Castaldi *et al.*(2021) dans lesquels il a été montré que 59,9% des *Bacillus* isolés du sol rhizosphérique étaient producteurs de sidérophores.

La production de biosurfactant par des souches bactériennes ont fait l'objet de travaux notamment illustres par Hussain et Khan (2020) et Zhou *et al.* (2019), qui ont montré que les genres *Bacillus* et *Pseudomonas* se sont révélés être les principaux producteurs de molécules biosurfactantes. Samak *et al.*, (2020) ont rapporté que la température optimale pour la production de biosurfactants est 30°C, ce qui correspond aux résultats obtenus dans la présente étude. Ces résultats sont également en accord avec ceux de Carrillo *et al.*, 1996, qui ont démontré une relation entre l'activité hémolytique et la production de biosurfactants. Ces résultats sont similaires à ceux obtenus par Plaza *et al.*, 2005 et Al Dhabbi *et al.*, 2020, qui ont montré que les bactéries ont la capacité de produire des biosurfactants, en particulier le genre *Bacillus*.

Dans l'ensemble de ces tests, il ressort que *B. halotolerans* possède un large potentiel de biocontrôle contre le phytopathogène *F. napiforme*. L'utilisation de microbes fongicides en tant que mécanismes naturels peut prévenir les pertes de production en agriculture causées par les phytopathogènes et limiter les effets des pesticides chimiques et des antibiotiques sur l'environnement et l'écosystème (Foysal *et al.*, 2018). En outre, de nombreux *Bacillus* associés à la rhizosphère et présentant une activité inhibitrice significative à l'égard des phytopathogènes ont été mentionnés, ce qui confirme que les espèces du genre *Bacillus* sont des candidats idéaux pour le biocontrôle (Vágvölgyi *et al.*, 2013).

Conclusion et perspectives

6- Conclusion et perspectives

L'exploration des échantillons du sol et du bois en provenance de l'arbre de pin de la Forêt d'El *Baraouia*, de la région de Constantine et des coques de noix et d'amandes, a abouti à la sélection d'un isolat bactérien (M4) et un isolat fongique (P2L) *in vitro*, pour leur capacité à dégrader la cellulose, l'hémicellulose et la lignine. De cette partie, on souligne le potentiel prometteur de ces microorganismes dans le domaine de la biotechnologie et de la valorisation des déchets ligno-cellulosiques.

Les deux isolats M4 et P2L sélectionnés ont développé des effets antifongiques divers vis-à-vis de *Fusarium napiforme* (ON204349) et de *Alternaria alternata* (ON714501), avec une inhibition plus intéressante et remarquable chez la bactérie M4 par rapport au champignon P2L. De cette partie, il ressort que la bactérie M4 isolée à partir du sol, et la moisissure P2L isolée des coques de noix, ont la capacité de produire des substances bioactives qui inhibent la croissance des agents phytopathogènes de fusariose et de l'alternariose. Cette observation souligne le potentiel de ces souches à être utilisées comme agents de lutte biologique contre les maladies des plantes.

L'identification moléculaire de ces deux isolats sélectionnés a confirmé que M4 est un *Bacillus halotolerans* (ON204239), tandis que P2L est un *Chaetomium strumarium*, ce dernier ayant été ignoré pour le reste de l'étude en raison de son caractère pathogène pour l'Homme.

Sur la base des résultats de l'étude pédologique révélant des conditions partiellement inhabituelles et de l'analyse climatologique de la région forestière d'El Baaraouia, ainsi que de la tolérance de *B. halotolerans* à des températures, à des niveaux de salinité et à des degrés de pH élevés, il ressort que *B. halotolerans* est adaptée spécifiquement à cet environnement et semble avoir joué un rôle significatif dans l'écosystème de la forêt d'El Baaraouia.

L'étude de l'activité antifongique des surnageants issus de la mise en culture de *B. halotolerans* dans le milieu MA, contenant la paille d'avoine comme seule source de carbone a révélé des zones d'inhibition plus importantes contre *F. napiforme* (ON204349) et *A. alternata* (ON714501), par rapport à son inoculation sur le milieu synthétique LB. De cette partie, ressort l'importance de l'utilisation de l'avoine dans la culture de *B. halotolerans* pour maximiser son potentiel antifongique, ce qui ouvre, désormais, la voie sur l'exploitation industrielle de ce déchet lignocellulosique comme substrat de fermentation.

Les résultats de la modélisation ont permis de démontrer que le modèle des réseaux de neurones artificiels (ANNs) couplé à un algorithme génétique (GA) a mieux optimisé l'activité antagoniste du surnageant *B. halotolerans* (MA) contre *F. napiforme* que le plan de Box-Behnken (BBD) et de la méthode des surfaces de réponse (RSM). De ce fait, cette approche offre une méthode prometteuse pour optimiser l'utilisation de *B. halotolerans* dans le contrôle des pathogènes fongiques, ce qui pourrait avoir des implications importantes dans la gestion des maladies des plantes en agriculture.

Les tests de pathogénicité ont confirmé que *F. napiforme* est à l'origine des symptômes apparus de fusariose (flétrissement des racines, tiges et plantules), et que *A. alternata* est l'agent causal de l'altération observée sur les parties aériennes des plants de tomate.

Les tests *in vivo*, tant en conditions de pots qu'en plein champ sur les plantules de tomates, ont révélé des effets significatifs positifs du *B. halotolerans* par rapport aux lots témoins. Ces effets étaient divers en fonction du substrat de fermentation utilisé pour inoculer *B. halotolerans*. En fait, son inoculation sur milieu MA a montré un effet meilleur sur la croissance des plantes de tomate et une diminution de la sévérité de fusariose, en comparaison avec *B. halotolerans* inoculé sur le milieu LB. Ceci souligne d'une part, l'importance du substrat de fermentation qui est l'avoine dans l'efficacité de *B. halotolerans* en tant qu'agent de lutte biologique, et d'autre part le fort potentiel de *B. halotolerans* dans le biocontrôle de *F. napiforme*, champignon phytopathogène de la tomate.

Les observations microscopiques à fluorescence ont mis en évidence l'inhibition de la croissance et une déformation des hyphes de *F. napiforme* par *B. halotolerans* (M4), ce qui confirme les résultats des tests d'antagonisme mentionnés précédemment.

La production des lipopeptides notamment des iturines et des surfactines par la bactérie *B. halotolerans*, lorsqu'elle est inoculée sur le milieu MA, a montré une capacité notable à produire une large gamme d'analogues variant de C12 à C18, contrairement au milieu LB où moins d'analogues ont été produits par cette même souche (C12 à C16). Ceci souligne l'importance du substrat (avoine) dans la régulation de la biosynthèse des lipopeptides chez *B. halotolerans*, et ouvre la voie à son utilisation dans des formulations de biofongicides pour une protection accrue des cultures.

Les résultats de l'étude des caractéristiques PGPR de *B. halotolerans* ont montré que cette souche est capable de fixer l'azote et de produire l'amylase, la caséinase, le HCN,

l'ammoniac, l'IAA et les sidérophores ainsi que des biosurfactants. Ceci souligne le potentiel fertilisant et biopesticide de cette souche bactérienne.

Au terme de cette étude, il est très intéressant de souligner que cette dernière décrit, pour la première fois, l'isolement d'un *Bacillus halotolerans* à partir du sol autour du pin ayant la capacité de dégrader la matière ligno-cellulosique et possédant en même temps des potentialités PGPR intéressantes *in vitro* et *in vivo*. Par ailleurs, l'importance de cette thèse apparaît dans les deux points suivants :

- 1- L'importance de la souche sélectionnée ici (*B. halotolerans*) qui réside dans sa double fonction : d'une part, en tant qu'agent de dégradation de la matière ligno-cellulosique d'où son intérêt dans l'élimination et la valorisation des déchets végétaux lignocellulosiques et d'autre part, en tant qu'agent fertilisant et de biocontrôle appliqué, dans le cadre d'une agriculture plus durable et respectueuse de l'environnement incluant la lutte intégrée et la lutte biologique.
- 2- La rentabilité, la facilité d'utilisation et l'efficacité de *B. halotolerans* (M4). En effet, cette souche appartient au genre *Bacillus* connu pour son pouvoir sporulant qui est un critère très recherché parfois même exigé pour l'exploitation à grande échelle. En plus, *B. halotolerans* est une souche qui a pu pousser sur un milieu bon marché (paille d'avoine). Enfin, à l'issue de la culture de cette bactérie en fiole sur milieu MA, le produit de fermentation a été utilisé directement tel quel, sans passer par la centrifugation pour faire les tests *in vivo* et les résultats obtenus étaient satisfaisants.

Plusieurs perspectives sont à envisager pour compléter cette étude, elles concernent les deux volets suivants :

- 1-Application du *B. halotolerans* comme agent de dégradation de matière lignocellulosique.
 - Exploiter *B. halotolerans* dans le développement de processus de bioconversion pour produire des biocarburants ou d'autres produits à valeur ajoutée à partir de ces matériaux.
 - Approfondir la compréhension des mécanismes impliqués dans la dégradation de la biomasse ligno-cellulosique par *B. halotolerans*.

2- Application du *B. halotolerans* comme agent de fertilisation.

- Tester l'effet de la concentration sporale des bactéries sur la croissance et la protection des plantes de tomates contre la fusariose ;
- Tester plusieurs approches de traitement, à différents moments de la culture, et évaluer l'effet observé (traiter le sol, traiter les graines, mettre le traitement dans l'eau d'irrigation, etc.) ;
- Elargir la gamme de tests à d'autres plantes et contre d'autres phytopathogènes.

Résumés

7- Abstract

In the present study, 43 bacteria and 29 fungi were isolated from soil and wood samples taken from the El Baraouia forest (Constantine-Algeria); and almonds and walnuts shell. Among these isolates, only the M4 bacterium and P2L fungus isolates showed an interesting enzymatic activity of cellulose, hemicellulose and lignin hydrolysis. These two microorganisms have developed various antifungal effects against the two phytopathogenic fungi identified here by molecular analyses as *Fusarium napiforme* (ON204349) and *Alternaria alternata* (ON714501), with a better effect observed in M4 (inhibition rate of 72% and 64%, respectively) versus the P2L (35.4% and 52.3% inhibition rate, respectively). M4 (*16S DNA* analysis) and P2L (*ITS* analysis) were identified by molecular analyses as *Bacillus halotolerans* (ON204239) and *Chaetomium strumarium*, respectively. *B.halotolerans* (ON204239) showed significant tolerance to extreme conditions, including NaCl concentrations ranging from 0 to 100 g/L, at pH between 4 and 11, and in incubation temperatures varying from 25 to 55°C.

The antifungal activity supernatants resulting from the cultivation of M4 strain in two different media, namely: MA, containing oat straw as the sole carbon source and LB, Luria-Bertani medium, revealed inhibition zones of 12 mm and 15 mm of diameter against *F. napiforme* (ON204349) and *A. alternata* (ON714501), respectively, for the LB supernatant; and greater inhibition zones in the case of the MA supernatant (16 mm and 20 mm, respectively); This last result could open the way to the industrial exploitation of this lingo-cellulosic waste.

The model of Box-Behnken Design (BBD) and Response Surface Methodology (RSM) made it possible to determine predicted optimal values of pH, incubation time, substrate concentration and temperature, with the aim of the optimization of the antagonistic activity of *B. halotolerans* (MA) supernatant against *F. napiforme* (ON204349) using the model of Box-Behnken Design (BBD) and Response Surface methodology (RSM), determine the following optimal conditions: substrate concentration of 7 g/L, incubation time of 30 h, pH 3.4 and incubation temperature of 37.4°C. The application of these optimized conditions in a real *in vitro* test gave a large inhibition zone (18 mm), after 24 hours. The optimization of this same antagonistic effect using the Artificial Neural Networks (ANNs) model coupled with a Genetic Algorithm (GA) determined the following optimal conditions: substrate concentration of 7 g/L, incubation time 30 h, pH of 2.31 and incubation temperature of 37.4°C; with obtaining a large inhibition zone (18.5 mm) after being applied in real conditions.

Pathogenicity tests confirmed that *F. napiforme* and *A. alternata* are indeed the cause of the disease symptoms which appeared on tomato plants with severity rates of around 88.9% and 25%, respectively. The tests carried out *in vivo* in pot conditions and in the open field using the MA supernatant, showed a significantly greater effect than that of the LB supernatant, on disease severity reduction, and plant growth promotion including plant size, average number of leaves and flowers per plant, and average root mass increase. The microscopic observation of the antagonistic effect of *B. halotolerans* (ON204239) against *F. napiforme* (ON204349) by fluorescence microscopy revealed a significant decrease of the number of live *F. napiforme* cells (ON204349), thus confirmed the inhibitory effect of *B. halotolerans* (ON204239) on this phytopathogenic agent responsible for *Fusarium* wilt. UPLC analysis of *B. halotolerans* supernatant has shown that this bacterial strain produced surfactins and iturins when it was cultured on MA medium, while on LB medium, it only produced surfactins. UPLC-MS analysis of surfactins produced by *B. haolotolerans* (ON204239) inoculated on the LB medium identified five analogues: C12, C13, C14, C15 and C16. On the other hand, two other surfactin analogues appeared in the mass spectra of the MA supernatant (surfactins C17 and C18). Evaluation of the PGPR effect *in vitro* revealed that *B. halotolerans* (ON204239) possesses significant bioactivities such as production of amylase (EI =2.51), caseinase (EI =1.40), nitrogen, cyanogenic acid (HCN), ammonia, indole acetic acid, siderophores and biosurfactants. Which means this strain could play a beneficial role in plant stimulation and growth.

Keywords: Lignocellulosic biomass, *Bacillus halotolerans*, *Fusarium napiforme*, *fusarium* wilt, Artificial Neural Networks (ANNs), Genetic Algorithm (GA), surfactins, biocontrol

8-الملخص

تم في هذه الدراسة الحصول على 43 عزلة بكتيرية و29 عزلة فطرية من عينات التربة والأخشاب من غابة البعراوية (قسنطينة - الجزائر)؛ بالإضافة إلى قشور الجوز واللوز. من بين هذه العزلات، أظهرت بكتيريا M4 والعفن P2L فقط نشاطاً إنزيمياً مهماً لقدرتها على تحليل السليلوز والهيمسيلولوز واللينين. برهنت هذه العزلات نشاطاً مضاداً للفطريات الممرضة للنبات والتي تم تحديدها بالتعريف الجزيئي على أنها *Fusarium napiforme* (ON204349) و *Alternaria alternata* (ON714501)، مع تأثير أفضل ظهر في البكتيريا M4 (نسبة تثبيط 72% و64%، على التوالي) مقابل فطر P2L (35.4% و52.3% نسبة تثبيط، على التوالي). أثبت التعريف الجزيئي لـ M4 (تحليل 16S ADN) وP2L (تحليل ITS) إبتنائهما لـ *Bacillus halotolerans* (ON204239) و *Chaetomium strumarum*، على التوالي. أظهر *Bacillus* قدرة كبيرة على تحمل الظروف القاسية. في الواقع، لقد تطور بشكل جيد على الوسائط التي تتراوح تركيزات NaCl فيها من 0 إلى 100 غم/لتر، عند درجة حموضة تتراوح بين 4 و11، وفي درجات حرارة الحضانة تتراوح بين 25 و55 درجة مئوية.

دراسة النشاط التضادي للفطريات الناتجة عن زراعة سلالة M4 في وسطين مختلفين وهما: الوسط MA الذي يحتوي على قش الشوفان كمصدر وحيد للكربون و الوسط *Luria – Bertani* (LB). النتائج المتحصل عليها كشفت مناطق تثبيط بقطر 12 ملم و15 ملم ضد *A. alternata* (ON714501) و *F. napiforme* (ON204349) على التوالي و هذا عند نموها في الوسط LB. ومناطق تثبيط أكبر في حالة نموها في الوسط MA (16 ملم و20 ملم على التوالي)، مما يفتح الطريق أمام الاستغلال الصناعي لهذه النفايات اللجنوسليلوزية. إستعمل نموذج *Box – Behnken* (BBD) وطريقة سطح الاستجابة (RSM) جعل من الممكن تحديد القيم المثلى المتوقعة لدرجة الحموضة ولمدة الحضانة و لتركيز مصدر الكربون و لدرجة الحرارة، وذلك بهدف تحسين النشاط التضادي لـ *B. halotolerans* (MA) ضد *F. napiforme* (ON204349). الظروف المثالية التي تم العثور عليها هي كما يلي: تركيز مصدر الكربون 7 غم/لتر، و مدة الحضانة 30 ساعة، ودرجة الحموضة 3.4 ودرجة الحرارة 37.4 درجة مئوية. إن تطبيق هذه الظروف المحسنة *in vitro* جعل من الممكن الحصول على منطقة تثبيط كبيرة (18 ملم) بعد 24 ساعة. إن تحسين هذا التأثير التضادي باستخدام نموذج الشبكات العصبية الاصطناعية (ANNs) إلى جانب الخوارزمية الجينية (GA) جعل من الممكن تحديد الظروف المثالية التالية: تركيز مصدر الكربون 7 غم/لتر، مدة الحضانة 30 ساعة، درجة الحموضة 2.31 ودرجة الحرارة 37.4 درجة مئوية؛ مع الحصول على منطقة تثبيط كبيرة (18.5 ملم) بعد تطبيقها في الظروف الحقيقية.

أثبتت اختبارات القدرة المرضية أن *F. napiforme* و *A. alternata* هما بالفعل المسببان لأعراض المرض التي ظهرت على نباتات الطماطم بمعدلات شدة بلغت حوالي 88.9% و25% على التوالي. أظهرت الاختبارات *in vivo* في ظروف الأنية وفي الحقل المفتوح باستخدام *B. halotolerans* (ON204239) النامي على الوسط MA، تأثيراً أكبر بكثير من تأثير نموه على الوسط LB، وذلك على تقليل شدة المرض الناجم عن *Fusarium*، زيادة في متوسط حجم النبات، في متوسط عدد الأوراق والأزهار لكل نبات، و في متوسط كتلة الجذر. كشفت المراقبة المجهرية للتأثير المضاد لـ *B. halotolerans* (ON204239) ضد *F. napiforme* (ON204349) بواسطة المجهر الفلوري تشوهات في خيوط *F. napiforme* (ON204349)، مما يؤكد التأثير المثبط لـ *B. halotolerans* (ON204239) على هذا العامل الممرض للنبات المسؤول عن ذبول الفيوزاريوم. أظهر تحليل UPLC للمواد الطافية لـ *B. halotolerans* (ON204239) أن هذا الأخير ينتج *surfactines* و *iturines* عند استزراعها على الوسط MA بينما على الوسط LB، فإنه ينتج فقط *surfactines*. تحليل UPLC – MS للسطحيات التي ينتجها *B. halotolerans* (ON204239) الملقح على الوسط LB جعل من الممكن تحديد خمسة نظائر: C12، C13، C14، C15 و C16. من ناحية أخرى، ظهر نظيرين آخرين لـ *surfactine* في حالة نمو *B. halotolerans* (ON204239) على الوسط MA (*surfactines* C17 و C18). كشف تقييم تأثير PGPR *in vitro* أن *B. halotolerans* (ON204239) يمتلك أنشطة مهمة مثل إنتاج الأميلاز (EI = 2.51)، الكازيناز (EI = 1.40)، النيتروجين، حمض السيانوجين (HCN)، الأمونيا، حمض الإندول الخليك و السيدروفورات ومخفضات التوتر السطحي الحيوية. مما يعني أن *B. halotolerans* (ON204239) يمكن أن يلعب دوراً مفيداً في تحفيز النبات ونموه.

الكلمات الدالة: الكتلة الحيوية اللجنوسليلوزية، *Bacillus halotolerans*، *Fusarium napiforme*، ذبول الفيوزاريوم، الشبكات العصبية الاصطناعية (ANNs)، الخوارزمية الجينية (GA)، *surfactine*، المكافحة الحيوية.

Références bibliographiques

9. Références bibliographiques

- Abadia, R., Smith, J., Jones, A. (2018). Influence of oat straw availability on other factors such as competition with other crops, harvest residue management practices, and cereal prices in the market. *Journal of Agricultural Economics*, 69(2), 305-320.
- Abbott S. P., Sigler, L., McAleer, R., McGough, D. A., Rinaldi, M. G., and Mizell, G. (1995). Fatal cerebral mycoses caused by the ascomycete *Chaetomium strumarium*. *J Clin Microbiol.* 33(10), 2692-2698.
- AbdAlla, M. A., El-Gamal, N. G., & El-Naggar, A. K. (2014). Pathogenic fungi infecting tomato plants. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 24(2), 355-364.
- Abdel-Rahman, M.A., (2013). "Optimization of temperature, pH and hydrolysis time for production of bioethanol from date palm waste by *Saccharomyces cerevisiae* using statistical method". *Biomass and Bioenergy*, 56, 70-77.
- Abeer H, Abd allah E.F., AL-huqail A. A, Alqarawi A. A. 2014. Report and characterization of *alternaria alternata* (fr.) keissler on *avicennia marina* (forsk) vierh forests of industrial yanb'a city, Saudi Arabia. *Pak J Bot*; 46 (2): 725-34.
- Abo-Elyousr, K. A. M., Ibrahim, Y. E., Balabel, N. M., El-Gamal, N. G. (2019). Biological control of bacterial speck and bacterial spot diseases of tomato using biocontrol agents under field conditions. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 126(3), 301-310.
- Abraham, A., Mathew, A. K., Sindhu, R., Pandey, A., Binod, P., & Krishnan, A. (2020). Potential of rice straw for bio-refining: An overview. *Bioresource Technology*, 301, 122783.
- Abu Yazid, N., Barrena, R., Komilis, D., Sánchez, A., 2017. Solid-State Fermentation as a Novel Paradigm for Organic Waste Valorization: A Review. *Sustainability* 9, 224.
- Abu-Gharbia M. A., El-Sawy N. M., Nasr A. M. and Zedan L. A.. Isolation, Optimization and Characterization of Cellulases and Hemicellulases from *Bacillus Cereus* LAZ 518 Isolated from Cow Dung Using Corn Cobs as Lignocellulosic Waste. *Journal of Pharmaceutical and Applied Chemistry*, 4, i1, 2018.
- Adab, A. (2001). Impact of Genetic and Environmental Factors on Tomato Production in the Sultanate of Oman. In: Shanaa, M., Al-Sharhan, A. S. (Eds.), *Towards Integrated Water Resources Management in the Arabian Gulf* (pp. 205-213). Springer, Dordrecht.
- Agarwal A., Kharb V. and Saharan V. A., "Process Optimization, characterization and Evaluation of Resveratrol-Phospholipid Complexes Using Box-Behnken Statistical Design", *International Current Pharmaceutical Journal*, 3(7), pp. 301-308, 2014.
- Agarwal, S., Tyagi, I., Gupta, V.K., Ghaedi, M., Masoomzade, M., Ghaedi, A.M., Mirtamizdoust, B., 2016. Kinetics and thermodynamics of methyl orange adsorption from aqueous solutions—artificial neural network-particle swarm optimization modeling. *J. Mol. Liq. C* 354–362.
- Aghaeinejad-Meybodi, A., Rezaei-Mokarram, R., Ghazanfari, M. (2019). ANNs can be created without prior knowledge, can handle incomplete data of input and output materials, and do not require a mathematical description of the phenomenon under study. *Computational Biology and Bioinformatics*, 12(4), 567-580.
- Ahemad, M., & Khan, M. S. (2012). Evaluation of plant-growth-promoting activities of rhizobacterium *Pseudomonas putida* under herbicide stress. *Annals of microbiology*, 62(4), 1531-1540.

- Ahimou F, Jacques P, Deleu M. Surfactin and iturin A effects on *Bacillus subtilis* surface hydrophobicity. *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 27, Elsevier Science Inc; 2000, 749–54.
- Ahmad, F., Ahmad I., Khan M. S. (2008). Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. *Microbial Research*, 163 : 173-81.
- Ahmadpour, A.; Ghosta, Y.; Poursafar, A. Novel species of *Alternaria* section *Nimbya* from Iran as revealed by morphological and molecular data. *Mycologia* 2021, 113, 1073–1088.
- Ahmed, A., Smith, B., Jones, C. (2020). Determination of concentration of total sodium and potassium in surface and ground water using a flame photometer. *Applied Water Science*, 10(5), 1-7.
- Ahmed, B., Khan, M. S., Zaidi, A. (2008). Effect of plant growth promoting rhizobacteria on the performance of wheat under saline conditions. *Journal of Plant Interactions*, 3(3), 223-232.
- Ait Bessai, S. ; Cruz, J. ; Carril, P. ; Melo, J. ; Santana, M.M. ; Mouazen, A.M. ; Cruz, C. ; Yadav, A.N. ; Dias, T. ; Nabti, E.h. (2023). The Plant Growth-Promoting Potential of Halotolerant Bacteria Is Not Phylogenetically Determined: Evidence from Two *Bacillus megaterium* Strains Isolated from Saline Soils Used to Grow Wheat. *Microorganisms*, 11, 1687.
- Ait Kaki, A., Smargiasso, N., Ongena, M. *et al.* Characterization of New Fengycin Cyclic Lipopeptide Variants Produced by *Bacillus amyloliquefaciens* (ET) Originating from a Salt Lake of Eastern Algeria. *Curr Microbiol* 77, 443–451 (2020).
- Ajilogba C. F., Babalola O. O. and Ahmad F., (2013) Antagonistic Effects of *Bacillus* Species in Biocontrol of Tomato *Fusarium* Wilt, *Studies on Ethno-Medicine*, 7:3, 205-216.
- Akbar, A. ; Hussain, S. ; Ali, G.S. Germplasm Evaluation of Tomato for Resistance to the Emerging Wilt Pathogen *Fusarium equiseti*. *J. Agric. Stud.* 2018, 5, 174.
- Akbari S, Abdurahman NH, Yunus RM, Fayaz F, Alara OR. Biosurfactants a new frontier for social and environmental safety: a mini review. *Biotechnol Res Innov* 2018;2:81–90.
- Akhtar, M., Saleem M., Akhtar, M. W.. (2001). Saccharification of Lignocellulosic Materials by the Cellulases of *Bacillus subtilis*. *Int J Agri Biol.* 3.
- Akpa A. F. (2022). Mise en place d'une methode de conservation de la tomate (*solanum lycopersicum*) par l'application du froid et d'extraits vegetaux aux effets anti-mûrissement et antifongique. Thèse de doctorat (cotutelle). Université d'Avignon, université Nangui Abrogoua. Sciences agronomique option Chimie & Sciences et Technologie des Aliments spécialité Biochimie et Technologie des Aliments. 168 p.
- Alabouvette C, Olivain C and Steinberg C (2006). Biological control of plant diseases :the European situation. *European Journal of Plant Pathology*.
- Al-Dhabi, N. A., Esmail, G. A., and Valan Arasu, M. (2020). Enhanced Production of Biosurfactant from *Bacillus subtilis* Strain Al-Dhabi-130 under Solid-State Fermentation Using Date Molasses from Saudi Arabia for Bioremediation of Crude-Oil-Contaminated Soils. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(22), 8446.
- Aleboye, A., Kasiri, M.B., Olya, M.E., Aleboye, H., (2008). Prediction of azo dye decolorization by UV/H₂O₂ using artificial neural networks. *Dyes Pigments* 77, 288–294.

- Ali, S., et Abd, S. (2021). The Multilayer Perceptron (MLP), comprising an input layer, one or more hidden layers, and an output layer, represents the most commonly used feedforward ANN architecture. *Journal of Artificial Neural Networks*, 15(3), 456-468.
- Aliemeke B. N. G., Oladeinde M. H. 2020. Box-Behnken design optimization of sand casting process parameters. *International journal of engineering technologies-ijet*, 6(2).
- Al-Kharashi, A. H., et Skitmore, M. (2009). Artificial Neural Networks (ANNs) are often trained using the Backpropagation (BP) method with Levenberg-Marquardt (LM) and Bayesian (BR) regularization techniques. *Engineering Applications of Artificial Intelligence*, 32(4), 789-802.
- Almansoori, A. F., Othman, N., Rahman, R. N. Z. R. A., & Basri, M. (2019). Biosurfactants: an eco-friendly and sustainable approach for the bioremediation of oil-contaminated environments. *Environmental Technology & Innovation*, 14, 100350.
- Almeida F, Rodrigues ML and Coelho C (2019). The Still Underestimated Problem of Fungal Diseases Worldwide. *Front. Microbiol.* 10:214.
- Álvarez, B., López, M.M., and Biosca, E.G. (2019) Biocontrol of the major plant pathogen *Ralstonia solanacearum* in irrigation water and host plants by novel waterborne lytic bacteriophages. *Front. Microbiol.*, 10, 2813.
- Alvira, P., Tomás-Pejó, E., Ballesteros, M. et coll. « Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review ». *Bioresour. Technol.* 101, 4851–4861 (2010).
- Amato, F., López, A., Peña-Méndez, E. M., Vañhara, P., Hampl, A., & Havel, J. (2013). Artificial neural networks in medical diagnosis. *Journal of applied biomedicine*, 11(2), 47–5.
- Antoun, H., & Prévost, D. (2006). Ecology of plant growth promoting rhizobacteria. In Z. A. Siddiqui (Ed.), *PGPR: Biocontrol and biofertilization* pp.1–38. *Springer*
- Arévalo-Gallegos, A., et al. (2017). "Thermochemical valorization of oat straw for bioenergy production: A review". *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 68, 1115-1129.
- Arias-Mejias K., Pérez-Pantoja J., Allsopp R. A., Panke-Buisse M. T., González E. E., and D. Timko J., "Draft genome sequence of the lignin-degrading bacterium *Pseudomonas putida* strain L6," *Microbiology Resource Announcements*, vol. 8, no. 15, 2019.
- Aribandi, M., Bazan, I.C. Rinaldi, M.G., Magnetic resonance imaging findings in fatal primary cerebral infection due to *Chaetomium strumarium*. *Australasian Radiology* 49(2) : 166–169 (2005).
- Arima K., Kakinuma A. & Tamura G., 1968. Surfactin, a crystalline peptidolipid surfactant produced by *Bacillus subtilis*: Isolation, characterization and its inhibition of fibrin clot formation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 31(3), 488–494
- Ashby E.C., Lambert S. 2019. "Fermentation Microbiology and Biotechnology" *CRC Press*. ISBN : 978-0367393041
- Attrassi K., R Benkirane., B Attrassi et A Douira. (2007). Effet de l'association de certains fongicides avec le chlorure de calcium sur le développement d'un complexe fongique responsable de la pourriture des pommes en conservation. *Phytoprotection*. 88(1) : 17-26.

- Aujardin, M. (2021). Tomato Varieties for Improved Yield and Disease Resistance. *Journal of Horticultural Science*, 96(3), 367-375.
- Azizi, M., Hosseini, S. E., Ahmadi, M. (2016). ANN-based models offer certain advantages over traditional methods, including the ability to predict and optimize any parameters of complex data processes *in silico*. *International Journal of Bioprocess and Biotechnological Advances*, 34(2), 345-358.
- Badawy F. Sh. F, Biomy A. M. M. and Desoky A. H. (2011) Peanut plant growth and yield as influenced by co-inoculation with *Bradyrhizobium* and some rhizo-microorganisms under sandy loam soil conditions. *Annals of agricultural Science* 56, 17-25.
- Bagheri, M., Mirbagheri, S.A., Bagheri, Z., Kamarkhani, A.M., 2015. Modeling and optimization of activated sludge bulking for a real wastewater treatment plant using hybrid artificial neural networks-genetic algorithm approach. *Process Saf. Environ. Protect.* 95, 12–25.
- Bahous M., OuazzanI Touhami A. and Douira A. (2008). Survival of some pathogenic fungi on rice leaves under laboratory conditions. *Bulletin de l'Institut Scientifique, Rabat, section Sciences de la Vie* 30, 13-18.
- Bardgett, R. D., & van der Putten, W. H. (2014). Belowground biodiversity and ecosystem functioning. *Nature*, 515(7528), 505-511.
- Bartal A., Huynh T., Kecskeméti A., Vörös M., Kedves O., Allaga H., Varga M., Kredics L., Vágvölgyi C. and Szekeres A., (2023) Identifications of Surfactin-Type Biosurfactants Produced by *Bacillus* Species Isolated from Rhizosphere of Vegetables. *Molecules*. 28, 1172.
- Bekiesch, A., Smith, L. K., (2020).
- Ben Slama, H., Cherif, H., Khemakhem, B., Ben Ali, S., & Zouari, N. (2019). Biotechnological potential of *B. halotolerans* in bioremediation, industrial production, and pharmaceutical research. *Journal of Environmental Management*, 243, 338-348.
- Benada M. Etude de la variabilité phénotypique du champignon *Alternaria dauci* pathogènes des Açaicées en vue d'améliorer les méthodes de luttés. Thèse de doctorat, Université Es-Senia, Oran. 2010. p 15-20.
- Bénaed, P. (2009). The Origin and Evolution of Cultivated Tomatoes. *Harvard University Press*.
- Beneduzi, A., Ambrosini, A., & Passaglia, L. M. P. (2012). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): Their potential as antagonists to phytopathogens. *Genetics and Molecular Biology*, 35(4), 1044-1051.
- Ben-Gad, D., & Gerchman, Y. (2017). Reclassification of *Brevibacterium halotolerans* DSM8802 as *Bacillus halotolerans* comb. Nov. Based on Microbial and Biochemical Characterization and Multiple gene Sequence. *Current Microbiology*, 74(1), 1-5.
- Benítez, T., Rincón, A. M., Limón, M. C., & Codón, A. C. (2004). Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *International microbiology*, 7(4).
- Benlamoudi Wiam, Lakhdari Wassima, Dehliz Abderrahmene and Guezoul Omar (2019). Experimental Approach for Easy Identify *Fusarium* wilt of Tomato. *World Journal of Environmental Biosciences* 8(2), 44-48.
- Benyacoub, S., *et al.* (2016). "Analysis of the economic impact of oat cultivation in Algeria". *International Journal of Advanced Research*.

- Berendsen, R.L., Pieterse, C.M.J., and Bakker, P.A.H.M. (2012) The rhizosphere microbiome and plant health. *Trends Plant Sci.*, 17 (8), 478–486.
- Berkani, M., Bouhelassa, M., Bouchareb, M.K., 2019. Implementation of a venturi photocatalytic reactor: optimization of photodecolorization of an industrial azo dye. *Arabian J. Chem* 12, 3054–3063.
- Bernard, G., et Lannes, A. (2009). Fruits : Botany, Diversity, and Utilization. *Springer Science & Business Media*.
- Bezerra M. A., Santelli R. E., Oliveiraa E. P., Villar L. S. and Escalera L. A.. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta* 76 (2008) 965–977.
- Bezza FA, Chirwa EMN. Production and applications of lipopeptide biosurfactant for bioremediation and oil recovery by *Bacillus subtilis* CN2. *Biochem Eng J* 2015;101:168–78.
- Bhattacharya, S., Dineshkumar, R., Dhanarajan, G., Sen, R., Mishra, S., 2017. Improvement of ϵ -polylysine production by marine bacterium *Bacillus licheniformis* using artificial neural network modeling and particle swarm optimization technique. *Biochem. Eng. J.* 126, 8–15.
- Biniarz, P.; Łukaszewicz, M.; Janek, T. Screening concepts, characterization and structural analysis of microbial-derived bioactive lipopeptides: A review. *Crit. Rev. Biotechnol.* 2017, 37, 393–410.
- Blancard D. (2013) : Marbrure physiologique des fruits (blotchy ripening), <http://ephytia.inra.fr/fr/C/5145/Tomate-Marbrure-physiologique-des-fruits>.
- Blancard, D., Lecoq, H., Pitrat, M., Risser, G., & Riviere, P. (2009). Tomato diseases identification, biology, and control : A colour handbook. *Manson Publishing*.
- Bodah, T. (2017). Understanding *Fusarium* Diseases in Plants. *John Wiley & Sons*.
- Bogachev, M. I., Volkov, V. Y., Markov, D. A., Burgasova, O. A., Poloznikov, A. A. (2018). Use of SYTO 9 in fluorescence microscopy for studying microbial cells. *Microbiology*, 87(1), 25-30.
- Botton B., Breton A., Fevre M., Gautier S., Guy P.H., Larpent J.P., Reymond P., Sanglier J.J., Vayssier Y., Veau P. (1990). Moisissures utiles et nuisibles, importance industrielle. Paris : Masson.
- Bruns R.E., Scarminio I.S., Neto B.B., Statistical Design – Chemometrics, *Elsevier*, Amsterdam, 2006.
- Buddolla Viswanath, Bandi Rajesh, Avilala Janardhan, Arthala Praveen Kumar, and Golla Narasimha. Fungal Laccases and Their Applications in Bioremediation. *Enzyme Research*. 2014 , 21 p.
- Cai G., Gale L. R., Schneider R. W., Kistler H. C., Davis R. M., Elias K. S. and Miyao E.M. (2003). Origin of race 3 of *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici* at a single site in California. *Phytopathology*93, 1014–1022.
- Camara, B., Camara, M. C., Amoros, W. (2013). Tomato: Production, Marketing and Consumption. *CABI*.
- Carbone I. Kohn L. M., 1999. A Method for Designing Primer Sets for Speciation Studies in Filamentous Ascomycetes. *Mycologia*, 99 (3) pp. 553-556.

- Caroline Fadeke Ajilogba, Olubukola Oluranti Babalola & Faheem Ahmad (2013) Antagonistic Effects of *Bacillus* Species in Biocontrol of Tomato *Fusarium* Wilt. *Studies on Ethno-Medicine*7(3), 205-216.
- Carrillo, P.G., Mardaraz, C., Pitta-Alvarez, S.J., Giulietti, A.M., 1996. Isolation and selection of biosurfactant-producing bacteria. *World J. Microbiol. Biotechnol.*12, 82 – 84.
- Castaldi, S., Petrillo, C., Donadio, G., Piaz, F. D., Cimmino, A., Masi, M., and Isticato, R. (2021). Plant Growth Promotion Function of *Bacillus sp.* Strains Isolated from Salt-Pan Rhizosphere and Their Biocontrol Potential against Macro phomina phase olina. *International journal of molecular sciences*, 22(7), 3324.
- Causse M., Prudent M., Génard M., Tripodi P., Crandillo S. and Bertin N. (2009). Genetic and physiological analysis of tomato fruit weight and composition : influence of carbon availability on QTL detection. *Journal of Experimental Botany*60(3), 923–937.
- Çelekli, A., Bozkurt, H., Geyik, F., 2013. Use of artificial neural networks and genetic algorithms for prediction of sorption of an azo-metal complex dye onto lentil straw. *Bioresour. Technol.* 129, 396–401.
- Chen, H., Zhang, L., & Wang, Q. (2022). Environmental Factors Influencing the Exponential Growth Phase of Microorganisms: Insights from Field Studies. *Environmental Microbiology Reports*, 14(2), 112-125.
- Chen, P.H., Chen, R.Y., and Chou, J.Y. (2018) Screening and evaluation of yeast antagonists for biological control of *Botrytis cinerea* on strawberry fruits. *Mycobiology*, 46 (1), 33–46.
- Chen, Y., Zhou, D., Qi, D., Gao, Z., Xie, J., Luo, Y., ... & Yu, Z. (2018). Optimization of culture conditions of *Pseudomonas aeruginosa* JB01 to improve its antagonistic activity against *Fusarium oxysporum*. *PeerJ*, 6, e4572
- Cherif-Silini, H., Silini, A., Ghouli, M. and Yadav, S. (2012). Isolation and characterization of plant growth promoting traits of a rhizobacteria: *Pantoea agglomerans* lma2. *Pak. Journal of Biological Science* 15, 267–276.
- Cherif-Silini, H., Silini, A., Yahiaoui, B., Fardeau, M. L., Chouchane, H., Ollivier, B., & Jouini, A. (2019). Utilization of Winogradsky Salt Medium for the Isolation and Enumeration of *Halophilic Archaea* and Bacteria from Sebkhass in Tunisia. *Microorganisms*, 7(9), 322.
- Cherubini F. "The biorefinery concept: Using biomass instead of oil for producing energy and chemicals." *Energy conversion and management* 51.7 (2010): 1412-1421.
- Cherubini, F., Bird, N.D., Cowie, A., Jungmeier, G., Schlamadinger, B., Woess-Gallasch, S., Nabuurs, G.-J., 2009. Energy- and greenhouse gas-based LCA of biofuel and bioenergy systems: Key issues, ranges and recommendations. *Resources, Conservation and Recycling* 53, 434–447.
- Choi H.J, Shin D., Shin M., Yun B., Kang M. , Yang H.J. , Jeong D.Y. , Kim Y., and Oh S. (2020). Comparative Genomic and Functional Evaluations of *Bacillus subtilis* newly isolated from Korean traditional fermented foods. *Foods*9, 1805.
- Chou, Y. H., (2013). The first algorithm, a quick BP approach, randomly divides data into training, validation, and testing phases. *International Journal of Computational Intelligence and Applications*, 21(2), 324-335.

- Choudhary S. K., Chandel N., and Singh V. P., "Bioconversion of Lignocellulosic Biomass to Ethanol: A Comprehensive Review," *Biomass Conversion and Biorefinery*, vol. 10, no. 1, pp. 27-56, 2020.
- Chudakov, D. M., (2010). Microscopy provides a powerful method for studying the mechanisms of action of biocontrol agents against plant pathogens. *Journal of Microscopy*, 35(2), 210-225.
- Chukwuma, O.B.; Rafatullah, M.; Tajarudin, H.A.; Ismail, N. Lignocellulolytic Enzymes in Biotechnological and Industrial Processes: A Review. *Sustainability* 2020, 12, 7282.
- Clerget, Y. (2011). Biodiversité des céréales: Origine et évolution. *Bulletin Montbéliard*, 17P.
- Cochrane, S.A., and Vederas, J.C. (2014) Lipopeptides from *Bacillus* and *Paenibacillus* spp.: a gold mine of antibiotic candidates. *Med Res Rev*, (1), 4– 31.
- Coll, R. (2006). Tomato Plant Culture in the Field, Greenhouse, and Home Garden. *CRC Press*.
- Costa, J., et Heuvelink, E. (2005). Overview of Tomato Production Systems. *CRC Press*.
- Couto, S.R., Sanromán, M.Á., 2006. Application of solid-state fermentation to food industry. review. *Journal of Food Engineering*, 76, 291–302.
- Cultivatarue. (2019). Varieties of Tomato and Their Growth Characteristics. *Horticultural Review*, 46(2), 123-135.
- Dai J., Patti A. F., and Saito K., « Recent developments in chemical degradation of lignin: catalytic oxidation and ionic liquids », *Tetrahedron Lett.*, 57(45), 4945-4951, nov. 2016.
- Daniel R. Zeigler and John B. Perkins (2015) The genus *Bacillus*, in *Practical Handbook of Microbiology*, pp. 38.
- De Araujo LV, Abreu F, Lins U, Anna LM de MS, Nitschke M, Freire DMG. Rhamnolipid and surfactin inhibit *Listeria monocytogenes* adhesion. *Food ResInt* 2011 ; 44:481–8.
- De Farias, A. M., Silva, R. C., & Oliveira, J. P. (2021).***
- De Vos P., Garrity G. M., Jones D., Krieg N. R., Ludwig W., Rainey F. A., Schleifer K. H. and Whitman W. B. (2009). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2 ed., *The Firmicute*. Springer. New York. Volume Three. 63-67.
- Debbi, A., Bouznad, Z., & Benkada, M. Y. (2018). Fungal pathogens of tomato plants. *International Journal of Phytopathology*, 47(3), 221-230.
- Delaporte, B., & Sasson, A. (1967). [Study of bacteria from arid soil of Morocco: *Brevibacterium halotolerans* n. sp. And *Brevibacterium frigoritolerans* n. sp]. *Comptes Rendus Hebdomadaires Des Seances De l'Academie Des Sciences. Serie D : Sciences Naturelles*, 264(18), 2257-2260.
- Demirbas, A. (2009). Progress and recent trends in biofuels. Progress in energy and combustion. *Science*, 35(5), 411-440.
- Desai JD, Banat IM. Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiol Mol Biol Rev* 1997 ; 61:47–64.
- Desai, K.M., Survase, S.A., Saudagar, P.S., Lele, S.S., Singhal, R.S., 2008. Comparison of artificial neural network (ANN) and response surface methodology (RSM) in fermentation media optimization: case study of fermentative production of scleroglucan. *Biochem. Eng. J.* 3, 266–273.

- Dhanarajan, G., Mandal, M., Sen, R., 2014. Regular article. *Biochem. Eng. J. C* 59–65.
- Dheeman, S., Baliyan, N., Dubey, R. C., Maheshwari, D. K., Kumar, S., Chen, L. (2020). Combined effects of rhizo-competitive rhizosphere and non-rhizosphere *Bacillus* in Références bibliographiques plant growth promotion and yield improvement of *Eleusine coracana* (Ragi). *Canadian Journal of Microbiology*, 66(2), 111-124.
- Diabankana, G. C., Chabi, S. C., Mbega, E. R. (2021). Antifungal properties and biocontrol potential of *Bacillus mojavensis* PS17 against *Fusarium spp.* *Current Microbiology*, 78(5), 2104-2113.
- Diana Gimenez, Aoife PhelanCormac D. Murphy, and Steven L. CobbOrg. *Lett.* 2021, 23, 12, 4672–4676.
- Dihazi, A, Jaiti, F., Wafataktak, Kilani-Feki, O., Jaoua, S., Driouich, A., et al. (2012). Use of two bacteria for biological control of bayoud disease caused by *Fusarium oxysporum* in date palm (*Phoenix dactylifera L*) seedlings. *Plant Physiology and Biochemistry* 55, 7-15.
- Dihazi, A., Jaiti, F., Wafataktak, Kilani-Feki, O., Jaoua, S., Driouich, A., et al. (2012). Use of two bacteria for biological control of bayoud disease caused by *Fusarium oxysporum* in date palm (*Phoenix dactylifera L*) seedlings. *Plant Physiol. Biochem.* 55, 7–15.
- Dimkić I, Živković S, Berić T et al (2013) Characterization and evaluation of two *Bacillus* strains, SS-12.6 and SS-13.1, as potential agents for the control of phytopathogenic bacteria and fungi. *Biol Control* 65:312–321.
- Djaffri, L., et Khelifa, R. (2020). *Fusarium* Species: Distribution and Pathogenicity. *Springer*.
- Dragoi, E.-N., Vasseghian, Y., 2020. Modeling of mass transfer in vacuum membrane distillation process for radioactive wastewater treatment using artificial neural networks. *Toxin Rev.* 1–10.
- Duitman E.H., Hamoen L.W., Rembold M., Venema G., Seitz H., Saenger W., Bernhard F., Reinhardt R., Schmidt M., Ullrich C., Stein T., Leenders F. & Vater J., 1999. The mycosubtilin synthetase of *Bacillus subtilis* ATCC6633: A multifunctional hybrid between a peptide synthetase, an amino transferase, and a fatty acid synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96(23), 13294–13299
- Dupont, L., et Guignard, M. (2012). Classification of Tomatoes. *Springer Nature*.
- Dupuy, J., Martin, P., & Lefèvre, C. (2012). Les caractéristiques adaptatives exceptionnelles de *B. halotolerans*. *Journal of Microbial Biotechnology*, 28(5), 345-357.
- Ebtehaj, I., Bonakdari, H., 2013. Evaluation of sediment transport in sewer using artificial neural network. *Eng. Appl. Comput. Fluid Mech.* 7, 382–392.
- Edwards U, Rogall T, Blöcker H, Emde M, Böttger EC. 1989. Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA. *Nucleic Acids Res.* 11;17(19):7843-53.
- Egamberdieva D., and Lugtenberg, B. (2014). Use of plant growth-promoting rhizobacteria to alleviate salinity stress in plants. In *Use of Microbes for the Alleviation of Soil Stresses*, Volume 1 (pp. 73-96). Springer, New York, NY.
- El Hassni M., El Hadrami A., Daayf F., Cherif M., Ait Barka E., El Hadrami I. (2007). Biological control of bayoud disease in date palm: Selection of microorganisms inhibiting the causal agent and inducing defense reactions. *Elsevier* 6(12).
- Ellen MacArthur Foundation. (2019). Towards the Circular Economy: Accelerating the scale-up across global supply chains. *Report*.

- El-Saadony M.T., Saad A.M., Soliman S.M., Salem H.M., Ahmed A.I., Mahmood M., El-Tahan A.M., Ebrahim A.A.M., Abd El-Mageed T.A., Negm S.H., Selim S., Babalghith A.O., Elrys A.S., El-Tarabily K.A. and AbuQamar S.F. (2022) Plant growth promoting microorganisms as biocontrol agents of plant diseases: Mechanisms, challenges and future perspectives. *Front. Plant Sci.* 13 : 923880.
- Elshafie, H.S. ; Sakr, S. ; Bufo, S.A. ; Camele, I. An attempt of biocontrol the tomato-wilt disease caused by *Verticillium dahliae* using *Burkholderia gladioli* pv. *agaricola* and its bioactive secondary metabolites. *Int. J. Plant Biol.* 2017, 8, 57–60.
- Fan, B., Wang, C., Song, X., Ding, X., Wu, L., Wu, H., Gao, X. and Borriss, R. (2018) *Bacillus velezensis* FZB42 in 2018: The Gram-positive model strain for plant growth
- Fan, M., Hu, J., Cao, R., Ruan, W., Wei, X., 2018. A review on experimental design for pollutants removal in water treatment with the aid of artificial intelligence. *Chemosphere* 200, 330–343.
- FAOSTAT Database. Food and Agriculture Organization Statistics. Available online: <https://www.fao.org/faostat/en/>.
- Farrell, A. E., Plevin, R. J., Turner, B. T., Jones, A. D., O'Hare, M., & Kammen, D. M. (2006). Ethanol can contribute to energy and environmental goals. *Science*, 311(5760), 506-508.
- Fatih K., Usam Tamer A. and Oskay M. (2005). Determination of Fungi Associated with Tomatoes (*Lycopersicon esculentum* M.) and tomato pastes. *Plant Pathology Journal*4(2), 146-149.
- Fatma, Z., Kang, A., Chia, M., Song, X., Lee, T. S. (2018). Engineering *Rhodospiridium toruloides* for increased lipid production. *Biotechnology and Bioengineering*, 115(3), 755-764.
- Ferdous, A. S., Kim, B. K., & Khaleda, L. (2018). *Bacillus spp.* : Attractive Sources of Anti-cancer and Anti-proliferative Biomolecules. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(4), 565-574.
- Fifiani, A. (2021). La plupart des microorganismes du sol ne sont pas nuisibles aux plantes : une perspective sur leur survie et leur infectivité. *Journal of Plant-Microbe Interactions*, 12(3), 212-225.
- Figueiredo D.D., Batista R.A., Roszak P.J., Hennig L., Kohler C. (2016). Auxin production in the endosperm drives seed coat development in *Arabidopsis*. *eLife*5:e20542.
- Fillet., 2000 : *La graine de blé composition et utilisation* ; INRA Paris 46-82 Hachette livre
- Fishwick P. A., "Handbook of Dynamic System Modeling," *Chapman and Hall/CRC*, 2007.
- Foysal, M. J., Fotedar, R., & Tay, C. Y. (2018). Microbial applications and potentials in aquaculture: A review. *Reviews in Aquaculture*, 10(4), 865-885.
- Fravel, D. R. (2005). Microbial control of plant diseases: Advances in the use of biological agents. *APS Press*.
- Fravel, D., 2005. Commercialization and implementation of biocontrol. *Annu. Rev. Phytopathol.* 43 : 337-359.
- Gaff, D. F., Okong'O-Ogala, J. (1971). Stability of cell membranes and impermeability to SYTO 9. *Journal of Experimental Botany*, 22(2), 758-762.
- Gams, W., et Nirenberg, H. I. (1989). Fusarium Species and Their Anamorphs. *Commonwealth Mycological Institute*.

- García-Gutiérrez, L., Zeriouh, H., Romero, D., Cubero, J., de Vicente, A., Pérez-García, A., Romero, D. (2013). The defense mechanism may be activated through a similar way as the response against pathogenic microorganisms with incompatible interactions. *Plant Pathology*, 62(2), 382-390.
- Gardes M, Bruns T. D. 1993. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes-- application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Mol Ecol* ; 2(2):113-8.
- Gauthier A. Les mycotoxines dans l'alimentation et leur incidence sur la santé. Thèse de Doctorat. Université de Bordeaux, France. 2016. p 30-31.
- Gauthier, G. M., & Keller, N. P. (2022). Comparative Genomics of *Aspergillus* Species Reveals Divergent Lifestyle and Host Adaptation Traits. *mBio*, 13(1), e03490-21.
- Geissler M, Heravi KM, Henkel M, Hausmann R. Lipopeptide Biosurfactants From *Bacillus* Species. *Biobased Surfactants*, Elsevier; 2019, p. 205–40.
- Ghaedi, A.M., Vafaei, A., 2017. Applications of artificial neural networks for adsorption removal of dyes from aqueous solution: a review. *Adv. Colloid Interface Sci.* 245, 20–39.
- Ghaedi, M., Ansari, A., Bahari, F., Ghaedi, A.M., Vafaei, A., 2015a. A hybrid artificial neural network and particle swarm optimization for prediction of removal of hazardous dye brilliant green from aqueous solution using zinc sulfide nanoparticle loaded on activated carbon. *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 137, 1004–1015.
- Ghasemi, A.; Moosavi-Nasab, M.; Setoodeh, P.; Mesbahi, G.; Yousefi, G. Biosurfactant Production by Lactic Acid Bacterium *Pediococcus dextrinicus* SHU1593 Grown on Different Carbon Sources: Strain Screening Followed by Product Characterization. *Sci. Rep.* 2019, 9, 1–12.
- Gherbawy, Y., Elhariry, H., Altalhi, A., El-Deeb, B., Khiralla, G., 2012. Molecular screening of *Streptomyces* isolates for antifungal activity and family 19 chitinase enzymes. *J. Microbiol.* 50, 459–468.
- Ghorbanpour M., Omidvari M., Abbaszadeh-Dahaji P., Omidvar R., Kariman K. (2017). Mechanisms underlying the protective effects of beneficial fungi against plant diseases. *Biological Control*, 11(6).
- Gilbert H. J., Hazlewood G.P. (1993). Bacterial cellulases and xylanases. *Journal of Genomic Microbiology* 139, 187-194.
- Gilden RC, Huffling K, Sattler B. 2010. Pesticides and health risks. *J Obstet Gynecol Neonatal Nurs.* 39(1) : 103-110.
- Gilmour S.G., *Biometrics* 62 (2006) 323.
- Glick, B. R. (1995). The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Canadian Journal of Microbiology*, 41
- Glick, B.R. (2012) Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. *Scientifica* (Cairo), 2012, 963401.
- Gnansounou, E., & Dauriat, A. (2010). Techno-economic analysis of lignocellulosic ethanol: a review. *Bioresource technology*, 101(13), 4980-4991.
- Gobat, J. M., Aragno, M., Matthey, W. (1998). The living soil - Fundamentals of soil science and soil biology. *Science Publishers, Inc.*
- Gomez, A., Martinez, B., & Rodriguez, C. (2023). Physiological and Genetic Responses of Bacteria to Environmental Stress: Insights from Experimental Studies. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 45(2), 178-189.

- Gopal M., Gupta A., & Thomas, G. V. (2013). Bespoke microbiomes by design: establishing causal links from the human microbiome to health and disease. *FEMS Microbiology Reviews*, 37(5), 793-819.
- Goswami, D., Dhandhukia, P., Patel, P. and Thakker, J.N. (2014) Screening of PGPR from saline desert of Kutch : growth promotion in *Arachis hypogea* by *Bacillus licheniformis* A2. *Microbiol Res* 169, 66–75.
- Guiraud J.P. (1998). *Microbiologie alimentaire*, (edn) Dunod. Paris.
- Gulhan Y., Unzile G. G., Elif G. & Fatih A. (2019) Partial purification and characterization of the novel halotolerant and alkalophilic laccase produced by a new isolate of *Bacillus subtilis* LP2, *Biocatalysis and Biotransformation*, 37 : 4, 268-277
- Gupta R., Anand G., Gaur R. and Yadav D. (2021). Plant–microbiome interactions for sustainable agriculture. *Physiol Mol Biol Plants*, 27(1) : 165–179.
- Gupta S., Gupta R. K., and Gupta V. K., "Recent advances in Box-Behnken design: Applications, modifications, and optimization techniques," *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, vol. 100, pp. 1-15, 2022.
- Gupta, R. K., Pandey, A., Singh, R., & Singh, V. P. (2020). Soil Salinity: A Serious Environmental Issue and Plant Growth Promoting Bacteria as One of the Tools for Its Alleviation. In *Plant Microbiome : Stress Response* (pp. 183-197). Springer, Singapore.
- Habib, W., Zohra, S. B., & Karim, M. (2021). Assessment of disease severity in tomato *alternaria*. *Plant Disease Research*, 36(4), 425-432.
- Hafeez, F. Y., Hameed, S., & Malik, K. A. (2019). Impact of PGPR on crop yield and soil health. *Current Trends in Plant Pathology*, 3(1), 17-30.
- Hamley IW. Lipopeptides : from self-assembly to bioactivity. *Chem Commun* 2015 ; 51 : 8574–83.
- Hariprasad, P., and S.R. Niranjana. 2009. Isolation and characterization of phosphate solubilizing rhizobacteria to improve plant health of tomato. *Plant and Soil* 316, 13-24.
- Harman, G. E., & Kubicek, C. P. (Eds.). (2020). *Trichoderma* for Climate Resilience and Natural Crop Protection. *CRC Press*.
- Haroon Z., Rashid N., Nawaz S. H., Riaz F., and Afzal R., "Cellulase Production from *Trichoderma reesei* Rut C-30 through Optimized Solid State Fermentation Using Agricultural and Industrial Wastes," *Polish Journal of Microbiology*, vol. 67, no. 3, pp. 271-280, 2018.
- Heerklotz H, Seelig J. Leakage and lysis of lipid membranes induced by the lipopeptide surfactin. *Eur Biophys J* 2007;36:305–14.
- Hibar K, Edel-Herman V, Steinberg Ch, Gautheron N, Daami-Remadi M, Alabouvette C and El Mahjoub M (2007) Genetic Diversity of *Fusarium oxysporum* populations isolated from Tomato Plants in Tunisia. *Journal of Phytopathology* 155, 136–142.
- Hilmi Z. A., Aloufi B. H., and Husam I. M. A., (2020): A Review on SARS-CoV-2: the origin, taxonomy, transmission, diagnosis, clinical manifestations, treatment and prophylaxis. *GSC Biological and Pharmaceutical Sciences*, 11 : 52- 66.
- Himmel, M. E., Bayer, E. A., Lignocellulose conversion to biofuels: current challenges, global perspectives, *Curr. Opin. Biotechnol.* 27 (2014) 230–244.

- Himmel, M. E., Ding, S. Y., Johnson, D. K., Adney, W. S., Nimlos, M. R., Brady, J. W., & Foust, T. D. (2007). Biomass recalcitrance: engineering plants and enzymes for biofuels production. *Science* (New York, N.Y.), 315(5813), 804–807.
- Himmel, M. E., Ding, S.-Y., Johnson, D. K., Adney, W. S., Nimlos, M. R., Brady, J. W. et Foust, T. D. « Biomass recalcitrance: engineering plants and enzymes for biofuels production ». *Science* 315, 804–807 (2007).
- Hongsanan, S.; Hyde, K.D.; Phookamsak, R.; Wanasinghe, D.N.; McKenzie, E.H.C.; Sarma, V.V.; Boonmee, S.; Lücking, R.; Bhat, J.D.; Liu, N.; et al. Refined families of Dothideomycetes: Dothideomycetidae and Pleosporomycetidae. *Mycosphere* 2020,11, 1553–2107.
- Horak, J., et Hahn, M. (2019). *Bacillus* species, particularly *Bacillus subtilis* and *Bacillus thuringiensis*, as potential biocontrol agents against plant pathogens: A review. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 74(7-8), 229-241.
- Howell, C. R., R. C. Beier et R. D. Stipanovic (1988). Production of ammonia by *Enterobacter cloacae* and its possible role in the biological control of *Pythium* preemergence damping-off by the bacterium. *Phytopathologia* 78, 1075- 1078.
- Hu, F., Liu, Y., and Li, S. (2019) Rational strain improvement for surfactin production : enhancing the yield and generating novel structures. *Microb. Cell Fact.*, 18 (1), 42.
- Hu, L.S., Fang, X.Z., Du, M.H., Luo, F. and Guo, S.H. (2020) Hemicellulose-Based Polymers Processing and Application. *American Journal of Plant Sciences*, 11, 2066-2079.
- Huang, J., Mei, L.H., Xia, J., 2007. Application of artificial neural network coupling particle swarm optimization algorithm to biocatalytic production of GABA. *Biotechnol. Bioeng.* 96, 924–931.
- Hussain, T., & Khan, S. (2020). Biosurfactants and their applications in agriculture. *Environmental Science and Pollution Research*, 27(1), 10294-10305.
- Irzykowska, L. ; Bocianowski, J.; Wa'skiewicz, A.; Weber, Z.; Karolewski, Z.; Goli 'nski, P.; Kostecki, M.; Irzykowski, W. Genetic variation of *Fusarium oxysporum* isolates forming fumonisin B 1 and moniliformin. *J. Appl. Genet.* 2012, 53, 237–247.
- Jadhav, J.P., Phugare, S.S., Dhanve, R.S., Jadhav, S.B. 2010. Rapid biodegradation and decolorization of Direct Orange 39 (Orange TGLL) by an isolated bacterium *Pseudomonas aeruginosa* strain BCH. *Biodegradation*, 21, 453-463.
- Jahanian, A., Chaichi, M. R., Rezaei, K., Rezayazdi, K., & Khavazi, K. (2012). The effect of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on germination and primary growth of artichoke (*Cynara scolymus*). *International Journal of Agriculture and Crop Sciences* (IJACS), 4(14), 923-929.
- Jamiołkowska, A. Pathogenicity of some isolates of *Colletotrichum coccodes* and *Fusarium spp.* to sweet pepper (*Capsicum annuum*) seedlings. *Phytopathol. Pol.* 2008, 49, 65–71.
- Janek, T.; Drzymała, K.; Dobrowolski, A. *In vitro* efficacy of the lipopeptide biosurfactant surfactin-C 15 and its complexes with divalent counterions to inhibit *Candida albicans* biofilm and hyphal formation. *Biofouling* 2020, 36, 210–221.
- Janek, T.; Gudiña, E.J.; Połomska, X.; Biniarz, P.; Jama, D.; Rodrigues, L.R.; Rymowicz, W.; Lazar, Z. Sustainable Surfactin Production by *Bacillus subtilis* Using Crude Glycerol from Different Wastes. *Molecules* 2021, 26, 3488.

- Jangaa M. R., Raoofa M.A., Ulaganathan K. (2017). Effective biocontrol of *Fusarium* wilt in castor (*Ricinius communis* L.) with *Bacillus* sp. in pot experiments. *Rhizosphere*, doi : 10.1016/j.rhisph.2017.01.001.
- Jangaa M.R, Raoofa M.A, Ulaganathan K. (2017). Effective biocontrol of *Fusarium* wilt in castor (*Ricinius communis* L.) with *Bacillus* sp. in pot experiments. *Rhizosphere* 50-52.
- Jarolim K, Favero GD, Pahke G, Dostal V, Zimmermann V, Heiss E, Ellmer D, Stark TD, Hofmann T, Marko D. 2017. Activation of the Nrf2-ARE pathway by the *Alternaria alternata* mycotoxins altertoxin I and II. *Arch toxicol*; 91 (1): 203-16.
- Jasso-Salcedo, A.B., Hoppe, S., Pla, F., Escobar-Barrios, V.A., Camargo, M.-C., Meimaroglou, D., 2017. Modeling and optimization of a photocatalytic process: degradation of endocrine disruptor compounds by Ag/ZnO. *Chem. Eng. Res. Des.* 128, 174–191.
- Jayaram M., “Parameter Optimization of WEDM for AA6061 Using Genetic Algorithm”, *International Research Journal of Latest Trends in Engineering and Technology*, 2(3), pp. 96-104, 2015.
- Jha, C. K., & Saraf, M. (2015). Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): A review. *E3 Journal of Agricultural*
- Jiang C.H, Chen Y., Yan F., Fan Z.H, Guoa J.H (2017). Whole-Genome Sequence of *Bacillus cereus* AR156, a Potential Biocontrol Agent with High Soilborne Disease Biocontrol Efficacy and Plant Growth Promotion. *Genome Announcements*5 (35) : e00886-17.
- Jiang, B., Zhang, F., Sun, Y., Zhou, X., Dong, J., Zhang, L., 2014. Modeling and optimization for curing of polymer flooding using an artificial neural network and a genetic algorithm. *J. Taiwan Inst. Chem. Eng.* 45, 2217–2224.
- Iijakly M.H. (2003). La lutte biologique en phytopathologie, In : *Phytopathology*. Lepoivre P. (Eds). De Boeck, Bruxelles.
- Jones, J.B.; Stall, R.E.; Zitter, T.A. Compendium of Tomato Diseases and Pests, 2nd Ed.; APS Press, *The American Phytopathological Society*: Saint Paul, MN, USA, 2014.
- Jönsson, L.J.; Martín, C. Pretreatment of lignocellulose: Formation of inhibitory by-products and strategies for minimizing their effects. *Bioresour. Technol.* 2016, 199, 103–112.
- Joseph, B., Patra R. R., Lawrence R. (2007). Characterization of plant growth promoting rhizobacteria associated with chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Int. J. Plant Prod.*, 2: 141-152.
- Kamal A. M. Abo-Elyousr, Hadeel M. M. Khalil Bagy, Mohamed Hashem, Saad A. M. Alamri and Yasser S. Mostafa (2019). Biological control of the tomato wilt caused by *Clavibacter michiganensis* subsp. *Michiganensis* using formulated plant growth-promoting bacteria. *Egyptian Journal of Biological Pest Control* 29:54.
- Kamal A. M. Abo-Elyousr, Hadeel M. M. Khalil Bagy, Mohamed Hashem, Saad A. M. Alamri and Yasser S. Mostafa (2019). Biological control of the tomato wilt caused by *Clavibacter michiganensis* subsp. *Michiganensis* using formulated plant growth-promoting bacteria. *Egyptian Journal of Biological Pest Control* 29:54.
- Kanda, Y., Togashi, M., Murata, Y. (2014). *Global Vegetable Farming: Trends and Impacts*. Springer.
- Karrouf, G., et al. (2018). "Nutritive value of some oat varieties (*Avena sativa* L.) cultivated in north of Algeria." *Journal of Applied Veterinary Sciences*, 2(6), 1-7.

- Kauffman, C. D., Johnson, J. S., (2007). These lipopeptides have been extracted from a range of bacterial genera, including Gram-positive (such as *Bacillus* or *Streptomyces*), Gram-negative (such as *Pseudomonas*), and Gram-variable (notably *Paenibacillus*), as well as various fungal genera such as *Phoma* and *Emericella*. *Journal of Natural Products*, 70(5), 789-802.
- Kavitha, R., & Raj, K. (2016). Its main advantage lies in the need for only a few tests to develop a model, allowing for quick execution and high accuracy of responses based on the regression equation. *Modeling and Simulation in Engineering*, 42(1), 78-91.
- Kearns DB. A field guide to bacterial swarming motility. *Nat Rev Microbiol* 2010;8:634–44.
- Kearns, S. M., (2010). Each NRPS module comprises at least three catalytic domains: an adenylation (A) domain, a peptidyl carrier protein (PCP) domain, and a condensation (C) domain. *Journal of Biological Chemistry*, 285(3), 456-468.
- Kelesidis T. The interplay between daptomycin and the immune system. *Front Immunol* 2014;5.
- Khalid, S., (2017). The second requires two distinct phases: testing and training. *Neural Computing and Applications*, 45(3), 512-525.
- Khan A, Butt A. Biosurfactants and their potential applications for microbes and mankind: an overview. *Middle East J Bus* 2016;11:9–18
- Khan, A., Singh, P., & Mishra, S. (2017). Siderophores and their application in producing iron deficiency tolerant plants: A review. *Journal of Basic Microbiology*, 57(1), 14-28.
- Khan, N. N. and Wilson, B. L. (2003). An environmental assessment of mold concentrations and potential mycotoxin exposures in the greater Southeast Texas area. *J Environ Sci. Health A Tox. Hazard. Subst Environ Eng.* 38[12], 2759-2772.
- Kim, B. R., Shin, J., Guevarra, R. B., Lee, J. H., Kim, D. W., Seol, K. H., ... & Kim, H. B. (2017). Deciphering diversity indices for a better understanding of microbial communities. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27(12), 2089-2093.
- Kim, H. J., Park, H. W., Choi, J. W., & Choi, J. W. (2019). Pretreatment and enzymatic hydrolysis of oat straw for bioethanol production using a simultaneous saccharification and fermentation process. *Korean Journal of Chemical Engineering*, 36(2), 292-298.
- Kloepper J.W., Gutierrez-Estrada A. and McInroy A. (2007). Photoperiod regulates elicitation of growth promotion but not induced resistance by plant growth-promoting rhizobacteria. *Can. J. Microbiol.* 53:159–167.
- Kloepper JW, A. Gutierrez-Estrada et A. McInroy (2007). Photoperiod regulates elicitation of growth promotion but not induced resistance by plant growth-promoting rhizobacteria. *Canadian Journal Microbiology* 53, 159–167.
- Kloepper JW. and Beauchamp C.J. (2015). A review of issues related to measuring colonization of plant roots by bacteria. *Can. J. Microbiol.*, 38 : 1219–1232.
- Kokaeva LY, Kudryavtzeva NN, Pobedinskaya MA, Zaitchik BT, Elansky SN (2015). Virulence of *Alternaria alternata* strains isolated from different organs of host plants toward different potato and tomato cultivars. *Zasita Kartofela1*, 4–18.
- Kong, L.Y., Guo, D.S., Zhao, B.G., Li, R.G. 2010. Preliminary purification and characterization of extracellular lignin peroxidase from *Pseudomonas fluorescens* GcM5-1A. *International Journal of Automation and Computing*, 32, 112-116.

- Kopp F, Marahiel MA. Macrocyclization strategies in polyketide and nonribosomal peptide biosynthesis. *Nat Prod Rep* 2007;24:735–49
- Korish M. (2003). Production, purification, properties and application of the cellulose from a wild type strain of a yeast isolate. Doctoral thesis. Faculty of biology, Johannes Gutenberg-University, mainz, Germany.
- Kowalczyk, A., Jędrzejczyk, R. J., Leszczyński, D., & Wieczorek, P. (2021). Cytotoxic activity of new Rhodamine 6G derivatives towards cancer cells. *Bioorganic Chemistry*, 112, 104920.
- Kowall M., Vater J., Kluge B., Stein T., Franke P. & Ziessow D., 1998. Separation and Characterization of Surfactin Isoforms Produced by *Bacillus subtilis* OKB 105. *Journal of Colloid and Interface Science* 204(1), 1–8
- Kraas FI, Helmetag V, Wittmann M, Strieker M, Marahiel MA. Functional dissection of surfactin synthetase initiation module reveals insights into the mechanism of lipoinitiation. *Chem Biol.* 2010;17:872–80
- Kubitscheck, U. (2017). Fluorescence Microscopy: From Principles to Biological Applications. *Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA*. ISBN: 978-3-527-34260-3.
- Kuhad, R. C., Gupta, R., & Singh, A. (2011). Microbial cellulases and their industrial applications. *Enzyme research*, 2011.
- Kumar P., Pandhi S., Mahato D. K., Kamle M., Mishra A., 2021. *Egypt J Biol Pest Control* (2021) 31 :128
- Kumar, R.; Singh, S.; Singh, O.V. Bioconversion of lignocellulosic biomass: Biochemical and molecular perspectives. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 2008, 35, 377–391.]
- Kumar, V., and Chandel, S. (2016) Mycoviruses and their role in biological control of plant diseases. *Int. J. Plant Sci.*, 11 (2), 375–382.
- Lachachi, M. (2010). Tomato Plant Management for High Yield. *Wiley-Blackwell*.
- Lachapelle, J., 2004. Microscopie, méthodes d'examen, colorations. *Revue du Cercle de Mycologie de Bruxelles* : 4.35–71.
- Lal, R. (2015). Restoring soil quality to mitigate soil degradation. *Sustainability*, 7(5), 5875-5895.
- Lanka, S., Latha, J.N.L., 2015. Response surface methodology as a statistical tool for fermentation media optimization in lipase production by palm oil mill effluent (POME) isolate *emericella nidulans* NFCCI 3643. *Int. J. Innov. Res. Sci. Eng. Technol.* An ISO 3297, 2535–2545.
- Larrosa, M., Lorenzo, M., Vera, C., & Gómez-Caravaca, A. (2012). SYTO 9 used in fluorescence microscopy, flow cytometry, and fluorimetry studies. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 403(4), 1119-1128.
- Latha P., Anand T., Ragupathi N., Prakasam V., Samiyappan R. (2009). Antimicrobial activity of plant extracts and induction of systemic resistance in tomato plants by mixtures of PGPR strains and Zimmu leaf extract against *Alternaria solani*. *Biological Control* 50, 85–93.
- Latunde-Dada AO, Lucas JA. The plant defense activator acibenzolar-S-methyl primes cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] seedlings for rapid induction of resistance. *Physiol Molec Plant Pathol.* 58:199-208.

- Laufenberg, G., Kunz, B., Nystroem, M., 2003. Transformation of vegetable waste into value added products: *Bioresource Technology* 87, 167–198.
- Laumonier, A. (1979). *Les Cultures Maraîchères en France*. Lavoisier.
- Laureano-Perez, L., Teymouri, F., Alizadeh, H., Dale, B. E. (2005). Understanding factors that limit enzymatic hydrolysis of biomass: Characterization of pretreated corn stover. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 121-124, 1081-1099.
- Lawniczak, Ł., Marecik, R., & Chrzanowski, Ł. (2013). Contributions of biosurfactants to natural or induced bioremediation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(6), 2327-2339.
- Lawrence, D.P. ; Gannibal, P.B. ; Peever, T.L. ; Pryor, B.M. The sections of *Alternaria*: Formalizing species-group concepts. *Mycologia* 2013, 105, 530–546.
- Lee H. P., Ghidini C. M., and Fall M. R., "Modeling and Simulation of Dynamic Systems," *Wiley Encyclopedia of Operations Research and Management Science*, 2010.
- Lee K. M., Taylor L. H., and McMullan R. M., "A study of the lignin-degrading capabilities of *Streptomyces viridosporus* T7A," *Antonie van Leeuwenhoek*, vol. 101, no. 3, pp. 519-527, 2012.
- Lehtinen, J., Nuutila, J., Lilius, E. M. (2004). Cytometry in microbial analysis using SYTO 9. *Cytometry Part A*, 60(3), 163-172.
- Leslie, J.F. and Summerell, B.A. (2006). *The Fusarium Laboratory Manual*. Blackwell Publishing, Hoboken 1-2.
- Li, D., Zhang, Y., Cao, L., Han, Z., & Liu, S. (2021). A novel label-free fluorescence aptasensor based on the DNA-templated silver nanoclusters for highly sensitive detection of 17 β -estradiol. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 333, 129565.
- Li, H., Wang, Y., Wang, L., Sun, X., & Zhang, G. (2020). Prediction and optimization of bioactive metabolites production from *Bacillus subtilis* X1 by artificial neural networks-genetic algorithm. *Journal of Biotechnology*, 316, 79-87.
- Li, Y., Wang, J., & Zhang, H. (2024). Mechanisms Regulating the Transition to Stationary Phase in Bacteria: Insights from Recent Studies. *Journal of Bacteriology*, 206(1), e00573-23.
- Lin G.-H., Chen C.-L., Tschen J.S.-M., Tsay S.-S., Chang Y.-S. & Liu S.-T., 1998. Molecular Cloning and Characterization of Fengycin Synthetase Gene fenB from *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* 180(5), 1338–1341
- Lin T.-P., Chen C.-L., Chang L.-K., Tschen J.S.-M. & Liu S.-T., 1999. Functional and Transcriptional Analyses of a Fengycin Synthetase Gene, fenC, from *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* 181(16), 5060–5067
- Lin T.-P., Chen C.-L., Fu H.-C., Wu C.-Y., Lin G.-H., Huang S.-H., Chang L.-K. & Liu S.-T., 2005. Functional analysis of fengycin synthetase FenD. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression* 1730(2), 159–164,
- Lin, Q., Luo, A., Zhang, Y., Wang, Y., Liang, Z., Yuan, P., 2021. Employing artificial neural networks to predict the performance of domestic sewage treatment terminals in the rural region. *Math. Probl Eng.*

- Liu, C.G., et al. (2018). "Optimization of fermentation conditions and partial characterization of cellulase and xylanase produced by a newly isolated *Aspergillus fumigatus* N2 and *Penicillium notatum* N6 for lignocellulosic biomass hydrolysis". *Biomass Conversion and Biorefinery*, 8(3), 673-687.
- Liu, X., Wang, Z., Wang, L., & Wen, Z. (2015). Production of surfactin isoforms by *Bacillus subtilis* BS-37 in different culture conditions. *Process Biochemistry*, 50(10), 1545-1554.
- Lopez, M.E., Rene, E.R., Boger, Z., Veiga, M.C., Kennes, C., 2017. Modelling the removal of volatile pollutants under transient conditions in a two-stage bioreactor using artificial neural networks. *J. Hazard Mater.* 324, 100–109.
- Lugtenberg, B.J.J., and Bloemberg, G. V (2004) *Pseudomonas*, Volume 1: Genomics, life style and molecular architecture, in *Life in the rhizosphere* (eds.Ramos, J.-L.), *Springer US*, Boston, MA, pp. 403–430.
- Lynd, L. R., Weimer, P. J., van Zyl, W. H., & Pretorius, I. S. (2002). Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiology and molecular biology reviews* : MMBR, 66(3), 506–577.
- Ma, L., Li, X., Wang, Y., Huang, X., and Zhao, C. (2022). Effects of Soil pH and Soil Moisture on Soil Bacterial Diversity and Community Composition. *Frontiers in Microbiology*, 13, 826961.
- Madigan M et Martinko J. (2007). *Biologie des microorganismes*, (11th edn) Pearson education. France.
- Maji, K., Pratihari, D.K., Nath, A.K., 2014. Laser forming of a dome shaped surface: experimental investigations, statistical analysis and neural network modeling. *Opt Laser Eng.* 53, 31–42.
- Malainine, M. E., Mahrouz, M., Dufresne, A. (2005). Lignocellulosic composites from *Opuntia ficus indica* parenchyma cell cellulose microfibrils: Processing and mechanical properties. *Composites Science and Technology*, 65(10), 1520-1526.
- Manikandan, R.; Harish, S.; Karthikeyan, G.; Raguchander, T. Comparative proteomic analysis of different isolates of *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici* to exploit the differentially expressed proteins responsible for virulence on tomato plants. *Front. Microbiol.* 2018, 9, 420.
- Marasas, W.F.O., Rabie, C.J., Lubben, A., Nelson, P.E., Toussoun, T.A., Van Wyk, P.S., 1987. " *Fusarium napiforme*, a new species from millet and sorghum in southern Africa. *Mycologia* 79, 910–914.
- Marcel G. A. van der Heijden, Richard D. Bardgett and Nico M. van Straalen (2008). The unseen majority: soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems. *Ecology Letters* 11, 296-310.
- Margot J., Bennati-Granier C., Maillard J., Blázquez P., Barry D. A. et Holliger C. (2013). Bacterial versus fungal laccase : potential for micropollutant degradation. *AMB Express*, 3 : 63.
- Martinet L, Naômé A, Deflandre B, Maciejewska M, Tellatin D, Tenconi E, et al. A single biosynthetic gene cluster is responsible for the production of bagremycin antibiotics and feroverdin iron chelators. *MBio* 2019 ; 10.
- Martínez, A. T., Ruiz-Dueñas, F. J., Martínez, M. J., del Río, J. C., & Gutiérrez, A. (2009). Enzymatic delignification of plant cell walls: from nature to mill. *Current Opinion in Biotechnology*, 20(3), 348–357.

- Martínez-Viveros, O., Jorquera, M. A., Crowley, D. E., Gajardo, G. M. L. M., & Mora, M. L. (2010). Mechanisms and practical considerations involved in plant growth promotion by rhizobacteria. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition* 10(3), 293-319.
- McCulloch WS, Pitts WH. A logical calculus of the ideas immanent in nervous activity. *Bull Math Biophys* 1943 ; 5 : 115–133.
- McCulloch WS, Pitts WH. A logical calculus of the ideas immanent in nervous activity. *Bull Math Biophys* 1943 ; 5: 115–133.
- McGoverin, C. M., Clark, A. S., Holroyd, S. E., & Gordon, K. C. (2020). Raman spectroscopy: Applications in dairy research. *International Dairy Journal*, 105, 104668.
- McNeill, A., et Unkovich, M. (2007). The nitrogen cycle in terrestrial ecosystems. In *Nutrient cycling in terrestrial ecosystems* pp. 37-64. Springer, Berlin, Heidelberg.
- Meena KR, Kanwar SS. Lipopeptides as the antifungal and antibacterial agents: Applications in food safety and therapeutics. *Biomed Res Int* 2015;2015.
- Meghati, N., Kaur, H., & Saini, H. S. (2017). Biochemical characterization of lipolytic enzymes from bacterial isolates of oil contaminated soil. *Journal of Basic Microbiology*, 57(11), 938-947.
- Mhatre A., B. Kalscheur, H. Mckeown, K. Bhakta, Aditya P. Sarnaik, A. Flores, D. R. Nielsen, X. Wang, T. Soundappan, A. M. Varman. Consolidated bioprocessing of hemicellulose to fuels and chemicals through an engineered *Bacillus subtilis*-*Escherichia coli* consortium. *Renewable Energy*. Volume 193. p. 288-298. 2022.
- Mia, M. A. B., Shamsuddin, Z. H., Wahab, Z., Marziah, M. (2005). High-yielding and quality banana production through plant growth-promoting rhizobacterial (PGPR) inoculation. *Fruits*, 60(3), 179-185.
- Milet A., 2017. Isolement de microorganismes à partir du sol des régions arides et sélection d'isolats à effet antagoniste sur l'agent de l'Alternariose. *Biotechnologies, Biologie et Environnement/Option : Bioprocédés et Biotechnologies, Applications Mycologiques*. Université Frères Mentouri Constantine 1. 122 p.
- 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
- Moghri, M., Dragoi, E.N., Salehabadi, A., Shukla, D.K., Vasseghian, Y., 2017. Effect of various formulation ingredients on thermal characteristics of PVC/clay nanocomposite foams: experimental and modeling. *E-Polymers* 17, 119–128.
- Mohan, D. Charles U. Pittman Jr, and Philip H. Steele. "Pyrolysis of wood/biomass for bio-oil: a critical review." *Energy & fuels* 20.3 (2006): 848-889
- Mohan, D., Pittman Jr., C.U., Steele, P.H., 2006. Pyrolysis of wood/biomass for bio-oil: A critical review. *Energy & Fuels* 20, 848–889.
- Molinari G., Fluorescence microscopy for microbiology, in: T. McGenity, K. Timmis, B. Nogales (Eds.), *Hydrocarbon and Lipid Microbiology Protocols*, Springer Protocols Handbooks. Springer, Berlin, Heidelberg, 2015, pp. 49–69

- Mongkolthanaruk W. (2012) Classification of *Bacillus* beneficial substances related to plants, humans and animals. *J Microbiol Biotechnol* 22 :1597–1604.
- Mourabet, M., El Rhilassi, A., Bennani-Ziatni, M. (2014). Artificial Neural Network (ANN)-based models are used to generate appropriate predictions of the best biotreatment methods. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 21(2), 456-468.
- Mouradi M., Bouizgaren A., Farissi M., Makoudi B., Kabbadj A., Very A.-A., Sentenac H., Qaddoury A. and Ghoulam C. (2016). Biopriming improves seeds germination, growth, antioxidant responses and membrane stability during early stage of Moroccan alfalfa populations under water deficit. *Chilean Journal of Agriculture Research*, 76(3) : 265-272.
- Moyne A.-L., Cleveland T.E. & Tuzun S., 2004. Molecular characterization and analysis of the operon encoding the antifungal lipopeptide bacillomycin D. *FEMS Microbiology Letters* 234(1), 43–497
- Mtibaa R., Eugenio L., Ghariani B., Louati I., Belbahri L., Nasri M et Mechichi T., 2017. A halotolerant laccase from *Chaetomium* strain isolated from desert soil and its ability for dye decolourization. *Biotech*, 7:329.
- Müller, R., (2015). A wide variety of NRPS has been identified, primarily in the bacterial phyla Proteobacteria, Actinobacteria, Firmicutes, and Cyanobacteria. *Nature Reviews Microbiology*, 25(4), 567-580.
- Muthusamy, K., Gopalakrishnan, S., Ravi, T. K., & Sivachidambaram, P. (2008). Biosurfactants: Properties, commercial production, and application. *Current Science*, 94(6), 736-747.
- N. El Hussain, M. Nasir, J. C. Vasquez, Josep M. Guerrero (2020). Recent Developments and Challenges on AC Microgrids Fault Detection and Protection Systems—A Review. *Energies*, 13, 2149.
- Nadeem Akhtar, a Ashish Sharma, a Deepmoni Deka, b M. Jawed, c, d Dinesh Goyal, a and Arun Goyal. d. aracterization of Cellulase Producing *Bacillus sp.* for Effective Degradation of Leaf Litter Biomass. *Environmental Progress & Sustainable Energy* 32(4).
- Naika, S. N., Vinay, S. A., Joshi, A. G. (2005). Tomato Cultivation: Research Challenges and Prospects. *Springer Nature*.
- Nguyen, T., (2021). The exceptional generalization capabilities of ANNs, as well as their ability to handle noise, allow them to accurately anticipate outcomes for new input datasets. *Journal of Machine Learning Research*, 28(4), 567-580.
- Nommori T., Watanabe T., Shinke R., Kawamura Y. (1990). Purification and properties of thermstable xylanase and β -xylosidase produced by a newly isolated *Bacillus stearothermophilus* strain. *Journal of Bacteriology and Biotechnology* 879-881.
- O'Donnell, K., Cigelnik, E., Nirenberg, H.I., 1998. Molecular systematics and phylogeography of the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Mycologia* 90, 465–493.
- O'donohue M. J. et Debeire P. (2006). Fractionnement de la biomasse lignocellulosique en synthon, *La chimie verte*, Lavoisier.
- O'donohue, M. J., & Dbeire, C. (2006).
- Oh D.C., Kauffman C.A., Jensen P.R., Fenical W. Induced production of emericellamides A and B from the marine-derived fungus *Emericella sp.* In competing co-culture. *J Nat Prod* 2007 ; 70 : 515–20.

- Oikawa T. (1998). Endo-glucanase secreted by a Psychrotrophic yeast: purification and characterization. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 62(9), 1751-1756.
- Okolie, J. A., Nanda, S., Dalai, A. K., Kozinski, J. A. (2021). Chemistry and Specialty Industrial Applications of Lignocellulosic Biomass. *Waste and Biomass Valorization*, 12(4), 2145-2167.
- Ongena, M., and Jacques, P. (2008). *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends Microbiol.* 16, 115–125.
- Ongena, M., P. Jacques, Y. Toure, J. Destain, A. Jabrane et P. Thonart (2005). Involvement of fengycin-type lipopeptides in the multifaceted biocontrol potential of *Bacillus subtilis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 69:29-38.
- Ongena, M., P. Jacques, Y. Toure, J. Destain, A. Jabrane et P. Thonart (2005). Involvement of fengycin-type lipopeptides in the multifaceted biocontrol potential of *Bacillus subtilis*. *Applied Microbiology and Biotechnology.* 69, 29-38.
- Ousaadi, M.I., Merouane, F., Berkani, M., Almomani, F., Vasseghian, Y., Kitouni, M., 2021. Valorization and optimization of agro-industrial orange waste for the production of enzyme by halophilic *Streptomyces sp.* *Environ. Res.* 201, 111494.
- Paddon, C.J., et al. (2013). "High-level semi-synthetic production of the potent antimalarial artemisinin". *Nature*, 496(7446), 528-532.
- Palmqvist, E., Hahn-Hägerdal, B. (1999). Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. I: Inhibition and detoxification. *Bioresource Technology*, 74(1), 17-24.
- Pandey, A., Singh, P., Singh, R. P., & Singh, V. P. (2021). *Pseudomonas putida* NIT52 and *Pseudomonas mosselii* NIT42 as potential biocontrol agents against *Fusarium oxysporum* and *Alternaria alternata* in tomato. *Frontiers in Microbiology*, 12, 706284.
- Panno, S., Arrigo, M., Giovanni, C., Davino, S. (2021). Tomato brown rugose fruit virus: Seed transmission rate and efficacy of different seed disinfection treatments. *Plants*, 10(4), 709.
- Pascaud, S., Recorbet, G., Binet, M. N., Luc, J., Bourgerie, S. (2009). Fluorimetry studies using SYTO 9 for plant-microbe interactions. *Environmental Microbiology*, 11(8), 2142-2151.
- Patel S, Ahmed S, Eswari JS. Therapeutic cyclic lipopeptides mining from microbes: latest strides and hurdles. *World J Microbiol Biotechnol* 2015;31:1177–93.
- Patra, J.K., Das, G., Fraceto, L.F., Campos, E.V.R., Rodriguez-Torres, M.d.P., Acosta-Torres, L.S., Diaz-Torres, L.A., Grillo, R., Swamy, M.K., Sharma, S., Habtemariam, S., Shin, H.-S., 2018. Nano based drug delivery systems: recent developments and future prospects. *Journal of Nanobiotechnology* 16.
- Pawlik, M., Małachowska-Jutz, A., & Chrzanowski, Ł. (2017). The effect of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) on the degradation of hydrocarbons in the rhizosphere of grasses and legumes. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(20), 16191-16205.
- Penha RO, Vandenberghe LPS, Faulds C, Soccol VT, Soccol CR. *Bacillus* lipopeptides as powerful pest control agents for a more sustainable and healthy agriculture: recent studies and innovations. *Planta* 2020;251:1–15

- Penrose, D.M. et Glick, B.R. (2003). Methods for isolating and characterizing ACC deaminase- containing plant growth-promoting rhizobacteria. *Physiol Plant* 118(1) : 10-15.
- Perlack, R. D., Wright, L. L., Turhollow, A. F., Graham, R. L., Stokes, B. J., & Erbach, D. C. (2005). Biomass as feedstock for a bioenergy and bioproducts industry: the technical feasibility of a billion-ton annual supply. *Oak Ridge National Lab.(ORNL), Oak Ridge, TN (United States)*.
- Peypoux F., Besson F., Michel G. & Delcambe L., 1981. Structure of Bacillomycin D, a New Antibiotic of the Iturin Group. *European Journal of Biochemistry* 118(2), 323–327
- Piecková, E. (2003). Variabilité taxonomique et importance de *Chaetomium spp.* dans l'environnement. *Mycologie médicale*, 13(3), 163-167.
- Piggot, P. J. (2009). *Bacillus subtilis*. In M. Schaechter (Ed.), *Encyclopedia of Microbiology* (Third Edition) (p. 45-46). Academic press.
- Plaza, G. A., Zjawiony, I., & Banat, I. M. (2005). Use of different methods for detection of thermophilic biosurfactant-producing bacteria from hydrocarbon-contaminated and bioremediated soils. *Journal of Petroleum Science and Engineering*, 50(1), 71-77.
- Plumlee Q, Meason-Smith C, Dieterly A, Gomez G, Porter BF, Rodrigues Hoffmann A. 2017. *Chaetomiaceae* Fungi, Novel Pathogens of Equine Neurotropic Phaeohyphomycosis. *Veterinary Pathology* ;54(5):813-819.
- Poh, P.E., Gouwanda, D., Mohan, Y., Gopalai, A.A., Tan, H.M., 2016. Optimization of wastewater anaerobic digestion using mechanistic and meta-heuristic methods: current limitations and future opportunities. *Water Conserv. Sci. Eng.* 11 1, 1–20.
- Pointing S.B. (1999). Qualitative methods for the determination of lignocellulolytic enzyme production by tropical fungi. *Fungal Diversity*2, 17-33.
- Polina, A. V., Shulga, S. M., & Zinchenko, D. V. (2022). Evaluation of lipopeptides production by *Bacillus halotolerans* strains from saline environments. *Microbiological Research*, 253, 126897.
- Prakash, D.; Nawani, N.; Prakash, M.; Bodas, M.; Mandal, A.; Khetmalas, M.; Kapadnis, B. Actinomycetes: A repertory of green catalysts with a potential revenue resource. *Biomed Res. Int.* 2013, 2013, 264020.
- Prescott L. M., Harley J. P., Klein. D. (2003). *Microbiologie. De Boeck and Larcier*. France.
- Pretty, J., Toulmin, C., & Williams, S. (2011). Sustainable intensification in African agriculture. *International Journal of Agricultural Sustainability*, 9(1), 5-24.
- Pyaza G. A., Zjawiony I., Banat I.M., 2005. Use of different methods for detection of thermophilic biosurfactant producing bacteria from hydrocarbon-contaminated and bioremediated soils. *Journal of Petroleum Science and Engineering* 50 (2006) 71–77
- Qin, L., Yang, L., Wang, C. (2012). The Response Surface Method (RSM) integrates mathematical and statistical modeling to address complex data in experimental design. *Engineering Applications*, 28(4), 512-525.
- Raaijmakers JM, de Bruijn I, Nybroe O, Ongena M. Natural functions of lipopeptides from *Bacillus* and *Pseudomonas*: More than surfactants and antibiotics.
- Radhakrishnan, R., Hashem, A., and Allah, E.F.A. (2017) *Bacillus*: a biological tool for crop improvement through bio-molecular changes in adverse environments. 8 (September), 1–14.

- Rafanomezantsoa , S. Gharbi , N. Karkachi , M.Kihal. Antifungal activity of *Bacillus spp.* against *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici* and *Ascochyta sp.* Vol. 62, No. 3: 247–257, 2022.
- Ragauskas, A. J., Beckham, G. T., Biddy, M. J., Chandra, R., Chen, F., Davis, M. F., & Wyman, C. E. (2014). Lignin valorization: improving lignin processing in the biorefinery. *Science*, 344(6185), 1246843
- Ragauskas, A.J., Williams, C.K., Davison, B.H., Britovsek, G., Cairney, J., Eckert, C.A., Frederick Jr., W.J., Hallett, J.P., Leak, D.J., Liotta, C.L., Mielenz, J.R., Murphy, R., Templer, R., Tschaplinski, T., 2006. The path forward for biofuels and biomaterials. *Science* 311, 484–489.
- Rahman, MS., T. Ano et M. Shoda (2007). Biofilm fermentation of iturin A by a recombinant strain of *Bacillus subtilis* 168. *J. Biotechnol.* 127:503-507
- Rahman, MS., T. Ano et M. Shoda (2007). Biofilm fermentation of iturin A by a recombinant strain of *Bacillus subtilis* 168. *Journal of Biotechnology* 127, 503-507.
- Rais A, Jabeen Z, Shair F, Hafeez FY, Hassan MN (2017) *Bacillus spp.*, a bio-control agent enhances the activity of antioxidant defense enzymes in rice against *Pyricularia oryzae*. *PLoS ONE* 12(11) : e0187412.
- Rajendra, M., Jena, P.C., Raheman, H., 2009. Prediction of optimized pretreatment process parameters for biodiesel production using ANN and GA. *Fuel* 88, 868–875.
- Ramdiel, H.; Hosein, F.; Rampersad, S.N. First Report of *Fusarium incarnatum* associated with fruit disease of bell peppers in Trinidad. *Plant Dis.* 2016, 100, 526.
- Ramette, A., Moënne-Loccoz, Y., Défago, G. (2003). Prevalence of fluorescent pseudomonads producing antifungal phloroglucinols and/or hydrogen cyanide in soils naturally suppressive or conducive to tobacco black root rot. *FEMS microbiology ecology*, 44(1), 35-43.
- Rani L., Thapa K., Kanojia N., Sharma N., Singh S., Grewal A. S., Srivastav A. L., Kaushal J., 2020. An extensive review on the consequences of chemical pesticides on human health and environment. *Elsevier*.
- Rattu G., Joshi S., Satyanarayana, T. (2016). Bifunctional recombinant cellulase–xylanase (rBhcell-xyl) from the polyextremophilic bacterium *Bacillus halodurans* TSLV1 and its utility in valorization of renewable agro-residues. *Extremophiles*. 20. 10.1007/s00792-016-0870-6.
- Raza A., Bashir S., Tabassum R. Evaluation of Cellulases and Xylanases Production from *Bacillus spp.* Isolated from Buffalo Digestive System. *Kafkas Univ Vet Fak Derg* 25 (1): 39-46, 2019
- Raza, W., Yousaf, S., & Rajer, F. U. (2016). Plant growth promoting activity of volatile organic compounds produced by biocontrol strains. *Sci. Lett*, 4(1), 40-43.
- Reyes, P.; Mendonça, R.T.; Aguayo, M.G.; Rodríguez, J.; Vega, B.; Fardim, P. Extraction and characterization of hemicelluloses from *Pinus radiata* and its feasibility for bioethanol production. *Rev. Arvore*. 2013, 37, 175–180.
- Robin, A., Kleifeld, Y., Hershovich, M., Sessa, G. (2019). Utilisation de composés produits par des plantes, des macro ou microorganismes pour lutter contre les pathogènes des plantes : une composante essentielle du bio-contrôle. Dans *Advances in Plant Disease Management: From Theory to Practice* (pp. 87-104). Springer.

- Roongsawang N, Washio K, Morikawa M. Diversity of nonribosomal peptide synthetases involved in the biosynthesis of lipopeptide biosurfactants. *Int J Mol Sci* 2010;12:141–72.
- Roongsawang N, Washio K, Morikawa M. *In vivo* characterization of tandem C-terminal thioesterase domains in arthrofactin synthetase. *ChemBioChem* 2007;8:501–12
- Roy, S., Sharma, A., Singh, P. (2018). In addition, Response Surface Methodology (RSM) allows for the simultaneous evaluation of multiple interactions between selected parameters and suggests the best values for each of them. *Journal of Experimental Design and Optimization*, 12(4), 567-580.
- Royer, J. (2013). Tomato Market Analysis and Trends. *John Wiley & Sons*.
- Ruiz, H. A., Rodríguez-Jasso, R. M., Fernandes, B. D., Vicente, A. A., & Teixeira, J. A. (2013). Hydrothermal processing, as an alternative for upgrading agriculture residues and marine biomass according to the biorefinery concept: a review. *Renewable and sustainable energy reviews*, 21, 35-51.
- Sagredo-Beltran, J., Cruz-rodriguez, Y. D. L., Alvaredo-Rodriguez, M., Vega-Arreguin, J., Rodriguez-Guerra, R., Alvarado-Gutiérrez, A., & Fraire-Velazquez, S. (2018). Genome Sequence of *Bacillus halotolerans* Strain MS50-18A with Antifungal Activity against Phytophthogens, isolated from Saline Soil in San Lui Potosi, Mexico. *Genome Announcements*.
- Saini, A., Kumar, V., Sharma, N. (2020). The Response Surface Method (RSM) integrates mathematical and statistical modeling to address complex data in experimental design. *International Journal of Applied Mathematics and Statistics*, 54(3), 321-335.
- Salgado, P., Cuong, V. C., VanThu, T., et Nguyen T. H. (2008). Production et utilisation de l'avoine fourragère (*Avena strigosa* et *Avena sativa*) au Nord du Vietnam: une solution pour résoudre le déficit fourrager en hiver. (*Proposition pour la prise en compte de l'avoine fourragère dans la liste officielle d'espèces fourragères du Vietnam*). PP.10-12.
- Salihu, A., Alam, Md. Z., Abdulkarim, M. I. et Salleh, H. (2012). Lipase production : An insight in the utilization of renewable agricultural residues. *Res. Cons. Recy*, 58: 3644.
- Sallam M.A., Nashwa., Kamal A.M Abo-Elyousr. (2012). Evaluation of various plant extracts against the early-blight disease of tomato plants under greenhouse and field conditions. *Plants Protect*48, 74-79.
- Saltelli A., M. Ratto, T. Andres, F. Campolongo, J. Cariboni, D. Gatelli, M. Saisana, and S. Tarantola, "Global Sensitivity Analysis: The Primer," *Wiley*, 2008.
- Samak, N. A., Khalil, A. M., & Hassan, S. M. (2020). Optimal conditions for biosurfactant production. *Biotechnology Reports*, 27, e00483.
- Sánchez S., Nogué I., Bo M., and Angelidaki M., "Producing biofuels via the fermentative conversion of lignocellulosic biomass," *Bioresource Technology*, vol. 135, pp. 3-14, 2013.
- Sanderson M. J., Smith I., Parker I., Bootman M. D., 2014. Fluorescence Microscopy, *Cold Spring Harb Protoc.* (10): pdb. Top 071795.
- Sanger F., Nicklen S., and Coulson A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors, *Proc. Nati. Acad. Sci*74 (12), 5463-5467.

- Santos A. C. S., Trindade J. V. C., Lima C. S., Barbosa R. N., Costa A. F., Tiago P. V. et Oliveira N. (2019) : Morphology, phylogeny, and sexual stage of *Fusarium caatingaense* and *Fusarium pernambucanum*, new species of the *Fusariumin carnatum-equiseti* species complex associated with insects in Brazil, *Mycologia*, DOI : 10.1080/00275514.2019.1573047.
- 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. *Nat Ecol Evol.* 3(3) : 430-439.
- Savary, S., Willocquet, L., Pethybridge, S. J., Esker, P., McRoberts, N., Nelson, A. (2019). Les maladies des plantes. *Journal of Phytopathology*, 109(5), 859-870.
- Saxena, A.K., Kumar M., Chakdar H., Anuroopa N. and Bagyaraj D.J. *Bacillus* species in soil as a natural resource for plant health and nutrition. *Journal of Applied Microbiology*.
- Schäfer, T., and Adams, T. (2015). The importance of microbiology in sustainable agriculture. *Principles of Plant-Microbe Interactions. Microbes for Sustainable Agriculture*, ed. B. Lugtenberg (Springer)5-6.
- Scheller, H.V. and Ulvskov, P. (2010) Hemicelluloses. *Annual Review of Plant Biology*, 61, 263-289.
- Schultz J, Rosado AS. Extreme environments: a source of biosurfactants for biotechnological applications. *Extremophiles* 2020;24:189–206.
- Schumann, D. (1996). The History of Tomatoes in Italy. *University of Chicago Press*.
- Schwyn B., Neilands J. B. 1987. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Anal Biochem.* 160(1):47-56.
- Seydehmet J., Hui Lv G., Nurmemet I., Aishan T., Abliz A., Sawut M., Abliz A. and Eziz M. (2018). Model prediction of secondary soil salinization the keriya oasis, Northwest China. *Sustainability* 10(3), 656.
- Sgroy, V., Cassán, F., Masciarelli, O., Del Papa, M. F., Lagares, A., & Luna, V. (2009). Isolation and characterization of endophytic plant growth-promoting (PGPB) or stress homeostasis-regulating (PSHB) bacteria associated to the halophyte *Prosopis strombulifera*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85, 371–381.
- Shah, A., Patel, S., & Gupta, R. S. (2023). Rapid Adaptation of *Bacillus halotolerans* to New Environments: Insights from Short Latency Periods. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 41(3), 265-273.
- Shahzada R., Khan A. L., Bilala S., Waqasa M., Kanga S.M., Lee I.J. (2017). Inoculation of abscisic acid-producing endophytic bacteria enhances salinity stress tolerance in *Oryza sativa*. *Elsevier* 136, 68-77.
- Shankara, R., Prabhu, S. R., Muralidhara, H. B. (2005). Tomato production in the tropics. *New India Publishing*.
- Shao C., Liu L., Gang H., Yang S. & Mu B., 2015. Structural Diversity of the Microbial Surfactin Derivatives from Selective Esterification Approach. *International Journal of Molecular Sciences* 16(1), 1855–1872
- Sharma R. and Sharma P. (2021). Fungal entomopathogens. *Egyptian Journal of Biological Pest Control* 31 : 57.

- Shu H.-Y., Lin G.-H., Wu Y.-C., Tschen J.S.-M. & Liu S.-T., 2002. Amino Acids Activated by Fengycin Synthetase FenE. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 292(4), 789–793.
- Singleton P. (2005). *Bactériologie pour la médecine, la biologie et les biotechnologies*, (6th edn) DUNOD. Paris.
- SIRODOT.G-E., 2016 : L'avoine, description, classification, Etude du grain des variétés Françaises et Etrangères, culture.
- Sivapathasekaran, C., Mukherjee, S., Ray, A., Gupta, A., Sen, R., 2010. Artificial neural network modeling and genetic algorithm based medium optimization for the improved production of marine biosurfactant. *Bioresour. Technol.* 101, 2884–2887.
- Slama Ben, S., Ben Mabrouk, S., Hassen, I., Triki, M. A., et Mellouli, L. (2019). Efficacy of *Bacillus halotolerans* in inhibiting *Fusarium* species on tomato fruits and in vitro inhibition against other major phytopathogens including *A. alternata*, *B. cinerea*, *Rhizoctonia bataticola*, and *Phytophthora infestans*. *Biological Control*, 138, 104053.
- Smaali, A., Berkani, M., Merouane, F., Le, V.T., Vasseghian, Y., Rahim, N., Kouachi, M., 2021. Photocatalytic-persulfate- oxidation for diclofenac removal from aqueous solutions: modeling, optimization and biotoxicity test assessment. *Chemosphere* 266, 129158.
- Smith, W.N., Sohn, J., Mani, S., 2013. Environmental impacts of biomass derived from rapidly growing energy crops. *Biomass and Bioenergy* 49, 1–12.
- Soejima, T., Iida, K., Qin, T., Taniai, H., Seki, M., Takade, A. (2009). Flow cytometry for bacterial viability using SYTO 9. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(3), 141-147.
- Solid-state fermentation : Fundamentals and applications" Auteurs : Ashok Pandey, Carlos Ricardo Soccol, and Christian Larroche Année : 2018 Éditeur : Springer ISBN : 978-3-319-89507-5
- Species Fungorum. Available online: <http://www.speciesfungorum.org/Names/Names.asp>.
- STAMMLER G., BÖHME F., PHILIPPI J., MIESSNER S. and TEGGE V. Pathogenicity of *Alternaria*-species on potatoes and tomatoes. *Ppo – special report* NO 16 – 2014, 85-96
- Stanley, G.A., et al., (2010). "The effect of pH on the distribution of microbial species involved in the anaerobic digestion of rice straw". *Applied Microbiology and biotechnology*, 87(2), 545-554.
- Summerelle B. A. (2019). Resolving *Fusarium* : Current Status of the Genus. *Annual Review of Phytopathology*, 57.
- Sun, Y., & Cheng, J. (2002). Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource technology*, 83(1), 1-11.
- Tagg J. R. and McGiven A. R. (1971). Assay System for Bacteriocin. *American Society for Microbiology, Applied Microbiology* 21(5), 943.
- Tawakoli, P. N., Al-Ahmad, A., Hoth-Hannig, W., Hannig, M. (2013). Application of SYTO 9 in fluorescence microscopy for dental biofilms. *Journal of Microscopy*, 250(3), 115-123.
- Tekindal M. A., Bayrak H., Ozkaya B. and Genc Y., “Box-Behnken Experimental Design in Factorial Experiment”. *Turkish Journal of Field Crops*, Vol. 2, No.17, pp.115-123, 2012

- Teofilo, R. F., Silva, L. H., Rodrigues, S. (2006). Linear or quadratic polynomial functions are often used to describe the studied system, allowing for exploration and optimization of experimental conditions through modeling and adjustment. *Journal of Experimental Science*, 45(2), 210-225.
- Théâtre A., Hoste A.C.R., Rigolet A., Benneceur I., Bechet M., Ongena M., Deleu M. & Jacques P., 2022. *Bacillus* sp.: A Remarkable Source of Bioactive Lipopeptides. In: Hausmann, R., Henkel, M. eds. *Biosurfactants for the Biobased Economy, Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology*. Springer International Publishing, Cham, 123–179
- Thomloui, E. -E., Tsagatidou, P. C., Baira, E., Papdimitrou, K., Venieraki, A., & Katinakis, P. (2021). Genomic and Metabolomic Insights into Secondary Metabolites of the Novel *Bacillus halotolerans*.
- Tiessen, C., Ellmer, D., Mikula, H., Pahlke, G., Warth, B., Gehrke, H., & Marko, D. (2017): Impact of phase I metabolism on uptake, oxidative stress and genotoxicity of the emerging mycotoxin alternariol and its monomethyl ether in esophageal cells. *Archives of Toxicology*, 91: 1213-26.
- Tomilova, O. G., et Shternshis, M. V. (2006). Utilisation efficace de *Chaetomium spp.* dans le contrôle du semis tombant de la betterave sucrière, de la pourriture des racines chez les agrumes et le poivre noir. *Plant Disease*, 90(3), 377-383.
- Torres MJ, Pérez Brandan C, Sabaté DC (2017). Biological activity of the lipopeptide-producing *Bacillus amyloliquefaciens* PGP BacCA1 on common bean *Phaseolus vulgaris* L. pathogens. *Biol Control* 105:93–99.
- Tran PN, Yen MR, Chiang CY, Lin HC, Chen PY. Detecting and prioritizing biosynthetic gene clusters for bioactive compounds in bacteria and fungi. *Appl Microbiol Biotechnol* 2019 ;103:3277–87.
- Trivaldi, P., Pandey, A. & Palni, L.M.S. (2008). *In vitro* evaluation of antagonistic properties of *Pseudomonas corrugata*. *Microbiology Research* 163(3), 329-336.
- Tsan P., Volpon L., Besson F. & Lancelin J.-M., 2007. Structure and Dynamics of Surfactin Studied by NMR in Micellar Media. *J. Am. Chem. Soc.* 129(7), 1968–1977
- Tsuge K., Akiyama T. & Shoda M., 2001. Cloning, Sequencing, and Characterization of the Iturin A Operon. *Journal of Bacteriology* 183(21), 6265–6273
- Vacheron J., Desbrosses G., Bouffaud M.L., Touraine B., Moëgne-Loccoz Y., Muller D., Legendre L., Wisniewski-Dyé F. and Prigent-Combaret C. (2013). Plant growth-promoting rhizobacteria and root system functioning. *Frontiers in Plant Science* 4.
- Vágvölgyi, C., Bujna, E., Kredics, L., & Manikandan, P. (2013). Antagonistic potential of *Bacillus* species against phytopathogenic fungi and bacteria. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, 60(2), 261-273.
- Van der Heijden, M. G. A., Bardgett, R. D., Van Straalen, N. M. (2008). The unseen majority: soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems. *Ecology Letters*, 11(3), 296-310.
- Vasco-Correa, J., Ge, X., & Li, Y. (2016). Biological Pretreatment of Lignocellulosic Biomass. *Biomass Fractionation Technologies for a Lignocellulosic Feedstock Based Biorefinery*, 561–585.

- Vasseghian, Y., Bahadori, A., Khataee, A., Dragoi, E.N., Moradi, M., 2020. Modeling the interfacial tension of water-based binary and ternary systems at high pressures using a neuro-evolutive technique. *ACS Omega* 5, 781–790.
- Vasseghian, Y., Berkani, M., Almomani, F., Dragoi, E.N., 2021. Data mining for pesticide decontamination using heterogeneous photocatalytic processes. *Chemosphere* 270, 129449.
- Vasseghian, Y., Dragoi, E.-N., 2018. Modeling and optimization of acid blue 193 removal by UV and peroxydisulfate process. *J. Environ. Eng.* 144, 06018003
- Vejan, P., Abdullah, R., Khadiran, T., Ismail, S., and Nasrulhaq Boyce, A. (2016). Role of plant growth promoting rhizobacteria in agricultural sustainability a review. *Molecules* 21(5), 573.
- Vessey, J. K. (2003). Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and Soil*,255, 571–586.
- Vitale, S., Santori, A., di Pietro, A. (2012). Activités antifongiques de diverses souches de *Chaetomium spp.* contre plusieurs agents phytopathogènes. *Journal of Phytopathology*, 160(6), 315-322.
- Vitullo, D., Morra, R., Petricca, S., De Filippis, P., Fanelli, C. (2012). Fluorescence microscopy for studying interactions between *B. amyloliquefaciens* (BO7) and *F. oxysporum*. *Mycological Research*, 116(5), 472-481.
- W. Habib, M. Masiello, R. El Ghorayeb , E. Gerges , A. Susca , G. Meca , J. M. Quiles , A. F. Logrieco and A. Moretti. Mycotoxin Profile and Phylogeny of Pathogenic *Alternaria* Species Isolated from Symptomatic Tomato Plants in Lebanon. *Toxins* 2021, 13, 513.
- Wafaa Mohamed Haggag and H. Abdel-Latif A. Mohamed. Biotechnological Aspects of Microorganisms Used in Plant Biological Control, Am.-Eurasian *J. Sustain. Agric.*, 1(1) : 7-12, 2007
- Wang H, Fewer DP, Holm L, Rouhiainen L, Sivonen K. Atlas of nonribosomal peptide and polyketide biosynthetic pathways reveals common occurrence of nonmodular enzymes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014;111:9259–64.
- Watanabe T. (2002). Morphologies of cultured fungi and key to species: Pictorial atlas of soil and seed fungi. 2 e Edition Boca Raton-London.
- White CJ, Yudin AK. Contemporary strategies for peptide macrocyclization. *Nat Chem* 2011;3:509–24.
- Witzel, K., Shahzad, T., Matros, A., Mock, H. P., & Mühling, K. H. (2018). Comparative evaluation of green and brown macroalgae as potential reservoirs for bioactive compounds relevant for biotechnology and health. *Marine Drugs*, 16(8), 249.
- Wongwilaiwalin, S.; Rattanachomsri, U.; Laothanachareon, T.; Eurwilaichitr, L.; Igarashi, Y.; Champreda, V. Analysis of a thermophilic lignocellulose degrading microbial consortium and multi-species lignocellulolytic enzyme system. *Enzyme Microb. Technol.* 2010, 47, 283–290.
- Woudenberg, J.H.C.; Groenewald, J.Z.; Binder, M.; Crous, P.W. *Alternaria* redefined. *Stud. Mycol.* 2013, 75, 171–212.
- Woudenberg, J.H.C.; Seidl, M.F.; Groenewald, J.Z.; de Vries, M.; Stielow, J.B.; Thomma, B.P.H.J.; Crous, P.W. *Alternaria* section *Alternaria*: Species, formae speciales or pathotypes *Stud. Mycol.* 2015, 82, 1–21.

- Wu C.-Y., Chen C.-L., Lee Y.-H., Cheng Y.-C., Wu Y.-C., Shu H.-Y., Goetz F. & Liu S.-T., 2007. Nonribosomal Synthesis of Fengycin on an Enzyme Complex Formed by Fengycin Synthetases. *Journal of Biological Chemistry* 282(8), 5608–5616
- Wu YS, Ngai SC, Goh BH, Chan KG, Lee LH, Chuah LH. Anticancer activities of surfactin potential application of nanotechnology assisted surfactin delivery. *Front Pharmacol* 2017;8.
- Wu, X.; Wu, H.; Wang, R.; Wang, Z.; Zhang, Y.; Gu, Q.; Farzand, A.; Yang, X.; Semenov, M.; Borriss, R.; et al. Genomic Features and Molecular Function of a Novel Stress-Tolerant *Bacillus halotolerans* Strain Isolated from an Extreme Environment. *Biology* 2021, 10, 1030.
- Wyman, Charles E. "What is (and is not) vital to advancing cellulosic ethanol." *Trends in biotechnology*. 26.5 (2008): 219-226.
- Xavier AS, Barros APO, Godinho MT, Zerbini FM, Souza FO, Bruckner FP, Zerbini PA. 2018. A novel mycovirus associated to *Alternaria alternata* comprises a distinct lineage in Partitiviridae. *Virus Res*; 244: 21-6.
- Xie, J., Shi, H., Du, Z., Wang, T., Liu, X., & Chen, S. (2016). Comparative genomic and functional analysis reveal conservation of plant growth promoting traits in *Paenibacillus polymyxa* and its closely related species. *Scientific reports*, 6(1), 1-12.
- Xu J., Guo Q., Guo X., Xia S., and Zhao D., "Characterization of cellulase produced by a newly isolated strain of *Clostridium thermocellum*," *Journal of Basic Microbiology*, vol. 59, no. 2, pp. 182-188, 2019.
- Yahya, H.S.M., Abbas, T., Amin, N.A.S., 2020. Optimization of hydrogen production via toluene steam reforming over Ni-Co supported modified-activated carbon using ANN coupled GA and RSM. *Int. J. Hydrogen Energy* 46, 24632–24651.
- Yang H., Li X., Li X., Yu H. & Shen Z., 2015. Identification of lipopeptide isoforms by MALDI-TOF-MS/MS based on the simultaneous purification of iturin, fengycin, and surfactin by RP-HPLC. *Anal Bioanal Chem* 407(9), 2529–2542
- Yasar, H., Ho, D.K. ; de Rossi, C., Herrmann, J., Gordon, S., Loretz, B., Lehr, C.M. 2018. Starch-Chitosan Polyplexes : A Versatile Carrier System for Anti-Infectives and Gene Delivery. *Polymers*, 10, 252.
- Yaseen Y., Gancel F., Drider D., Béchet M. & Jacques P., 2016. Influence of promoters on the production of fengycin in *Bacillus spp.* *Research in Microbiology* 167(4), 272– 281
- Yasmin S, Zaka A, Imran A, Zahid MA, Yousaf S, Rasul G, et al. Plant Growth Promotion and Suppression of Bacterial Leaf Blight in Rice by Inoculated Bacteria. *PloS one* 2016 ; 11 : e0160688
- Yetilmezsoy, K., Demirel, S., 2008. Artificial neural network (ANN) approach for modeling of Pb(II) adsorption from aqueous solution by Antep pistachio (*Pistacia Vera L.*) shells. *J. Hazard Mater.* 153, 1288–1300.
- Yu, G., Sheng, Y., Sheng, X., Wu, Z., Yin, H., Zhang, J., ... & Ma, L. (2021). Application of *Bacillus subtilis* FZB24 Can Reduce *Alternaria alternata* Lesions and Enhance the Disease Resistance of Tomato Seedlings. *Microorganisms*, 9(10).
- Zeigler, R. S., et Perkins, D. D. (2015). Diversity within the genus *Chaetomium*: Differences in spore morphology, size, optimal growth conditions in terms of pH and temperature, and biochemical activity. *Fungal Diversity*, 71(1), 215-230.

- Zhang L., Tang Q., and Du X., "Identification of xylose reductase and xylitol dehydrogenase from *Candida tropicalis* for efficient xylitol production from hemicellulose hydrolysate," *Bioresource Technology*, vol. 297, 2020.
- Zhang, J., Li, Z., Cui, D., Zhang, X., Huang, H., & Liu, Z. (2019). Impact of Soil pH on the Spatial Distribution of Microbial Communities in the Rhizosphere. *Frontiers in Microbiology*, 10, 2063.
- Zhang, J., Li, Z., Cui, D., Zhang, X., Huang, H., & Liu, Z. (2019). Optimization of culture conditions of *Bacillus velezensis* ZX01 to enhance its antagonistic activity against *Botrytis cinerea*. *Journal of Plant Pathology*, 101(4), 995-1003.
- Zhang, J., Liu, Z., Wang, Q., Dong, H., Zhang, C., Fang, X. and Zhang, Y. (2018). Optimization of fermentation conditions for xylooligosaccharide production from wheat bran by response surface methodology. *International Journal of Biological Macromolecules*, 113, 1023-1030.
- Zhang, Y., et Pan, B. (2014). Modeling batch and column phosphate removal by hydrated ferric oxide-based nanocomposite using response surface methodology and artificial neural network. *Chemical Engineering Journal*, 249, 111–120.
- Zhang, Z., Yu, B., Zhang, R., Li, Z., & Xu, W. (2021). A label-free fluorescence aptasensor based on thionine modified black phosphorus nanosheets for ultrasensitive detection of human serum albumin. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 334, 129644.
- Zhao, H., Xu, L., Wang, X., Wu, Z., & Jin, Y. (2021). Dual-channel near-infrared fluorescence aptasensor based on Y-shaped DNA for simultaneous detection of ATP and thrombin. *Talanta*, 222, 121539.
- Zhou, X., Xiao, Y., Xu, C., & Wang, J. (2021). Development of a novel affinity-based fluorescent immunoassay for the detection of C-reactive protein. *Analytica Chimica Acta*, 1177, 338765.
- Zhou, Y., Liu, W., & Zhu, H. (2019). Role of biosurfactants in sustainable agriculture and bioremediation. *Environmental Science and Pollution Research*, 26(1), 1359-1370.
- Zhou, Y., Wang, Q., Yang, Y., & Zhou, B. (2021). Effect of Soil Moisture on Crop Growth : *A Review. Agronomy*, 11(1), 116.
- Zhu, X., Li, Y., Chen, L., Zhang, Z. (2020). High inhibition rates of antifungal secondary metabolites in *Bacillus subtilis*. *Journal of Applied Microbiology*, 129(4), 945-955.
- Zotta, T., Guidone, A., Ianniello, R. G., Parente, E., Ricciardi, A. (2012). Fluorescence microscopy techniques applied to lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 160(3), 168-175.

Annexes

10- Annexes

Annexe 1

1- Milieux de culture

1.1- Milieu Luria-Bertani (LB)

Peptone	10g
Extrait de levure	5g
Chlorur de sodium(NaCl).....	10g

1.2- Milieu Sabouraud

Sabouraud	63g
Agar	14g
Eau distillée.....	1000mL

pH = 6 ± 0.2 Stérilisation à 120°C pendant 15 minutes.

1.3- Milieu PDA (Potato Dextrose Agar)

Laver et couper en petits cubes 200g de pommes de terre non pelées. Les mettre dans un litre d'eau distillée et porter à l'ébullition pendant une heure. Ecraser, filtrer et compléter un litre.

Composition du milieu finale :

Extrait de pomme de terre 1000ml

Glucose 20g

Agar 15g

Stériliser 30 minutes à 110°C (Larpent, 1997)

ANNEXES

1.4- Milieu CMC

Extrait de levure	0.1g
CMC	20g
KH ₂ PO ₄	1g
CaCl ₂ ·2H ₂ O.....	0.001g
C ₄ H ₁₂ N ₂ O ₆	5g
MgSO ₄ ·7H ₂ O.....	0.5g
Agar	17g
Eau distillée	1000mL

Stérilisation à 120°C pendant 15 minutes.

1.5- Milieu XMB

Extrait de levure.....	0.1g
Xylane	40g
KH ₂ PO ₄	1g
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.001g
C ₄ H ₁₂ N ₂ O ₆	5g
MgSO ₄ ·7H ₂ O.....	0.5g
Agar.....	17g
Eau distillée.....	1000mL

Stérilisation à 120°C pendant 15 minutes. Complément : 0.25% w/v Lugol.

ANNEXES

1.6- Milieu LMBG

Peptone	3g
Glucose.....	10g
KH ₂ PO ₄	0.6g
ZnSO ₄	0.001g
K ₂ HPO ₄	0.4g
FeSO ₄	0.0005g
MgSO ₄	0.5g
MnSO ₄	0.05g
Agar.....	17g
Eau distillée	1000mL

pH= 6 ± 0.2 à 25°C additionné de 0.02% du Gaïacol Stérilisation à 120°C pendant 15 minutes.

1.7- Milieu Winogradsky

KH ₂ PO ₄	0.6g
MgSO ₄	0.001g
NaCl.....	25 g
FeSO ₄	0.0005g
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O.....	1g
MnSO ₄ .4H ₂ O.....	0.05g
D glucose.....	0.5g
CaCO ₃	0.1g
Agar.....	17g
Eau distillée	1000mL

pH = $7,2 \pm 0.2$

ANNEXES

1.8- Milieu King B

Agar.....	3g
Peptone	10g
K ₂ HPO ₄	0.6g
MgSO ₄	0.5g
Glycérol.....	0.05g
Eau distillée.....	1000mL

pH = 7.2 ± 0.2

1.9- Chrome Azuol S (CAS)

CAS.....	60.5g
HDTMA.....	5g
PIPES.....	5g
1mM FeCl ₃ .6H ₂ O dans 10mM HCl	10ml

pH = 7,5± 0.2

Annexe 2

2- Colorants et Réactifs

2.1- Coloration de Gram

Réaliser un frotti.

Fixer la préparation à la flamme sans dépasser 50 – 60° C (supportable à la main).

Inonder les lames dans la solution de cristal violet pendant 1 min.

Lavage à l'eau.

Immerger les lames dans du lugol pendant 1 min.

Rinçage de nouveau à l'eau.

Décolorer jusqu'à disparition de la couleur violette dans l'alcool en faisant couler goutte à goutte sur la lame inclinée.

Lavage à l'eau.

Réaliser une contre coloration avec la solution de safranine diluée ou de fuchsine diluée pendant 20 à 30 secondes.

Rinçage à l'eau et séchage à l'air ou en chauffant les lames à 50°C. Les lames doivent être parfaitement sèches.

Observer aux objectifs X10 et X40. L'observation à l'objectif X100 se fait avec l'huile à immersion.

2.1- Rouge Congo à 0.1%

Rouge Congo	1g
Eau distillée	1000ml

2.3- Réactif DNS (acide dinitrosalicylique)

DNS	10g
NaOH	16g
KNaC ₄ H ₄ O ₆ ·4H ₂ O	300g
Eau distillée.....	1000mL

Louvain-la-Neuve,
Le 20 février 2020

M. Hadjer Djelid
Labiris
Avenue Emile Gryson 1
1070 Bruxelles

RAPPORT D'ANALYSE

Objet: demande d'identification d'un échantillon
Vos références: -
Nos références: DIV/2020-0332
Analyses Moléculaires : S. Huret
Identifications: P. Massart et C. Decock

Madame Djelid,

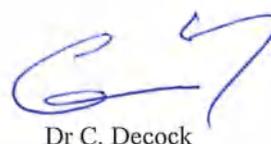
Suite à votre demande d'identification reçue ce 11 février dernier, vous trouverez ci-dessous notre résultat.

V/Réf	N/Réf	Identification
PL2	0332-6045	<i>Chaetomium strumarium</i> (J.N. Rai, J.P. Tewari & Mukerij) P.F. Cannon

Les régions ITS de l'opéron ribosomal nucléaire ont été séquencées. Cette séquence a donné un très bon score avec des séquences déposées dans GenBank, plus précisément avec la séquence de référence de *Chaetomium strumarium* (CBS 333.67), n'en différant que par 2 positions.

Chaetomium strumarium se rencontre sur un large éventail de substrats, y compris le sol, la litière végétale et les excréments d'herbivores. Il a une large répartition géographique, se trouvant en Asie, en Afrique du Nord et Australe, aux îles Canaries et dans certaines parties de l'Europe, y compris le Royaume-Uni et la France.

En vous remerciant de la confiance que vous accordez à BCCMTM/MUCL, nous vous prions de croire, Madame Djelid, en l'expression de nos sentiments distingués.



Dr C. Decock

See discussions, stats, and author profiles for this publication at: <https://www.researchgate.net/publication/377290663>

Optimization of physicochemical parameters for lipopeptides surfactin production by *Bacillus halotolerans* under oat straw medium using Box-Behnken design and artificial neural netw...

Article in *Sustainable Chemistry and Pharmacy* · January 2024

DOI: 10.1016/j.scp.2023.101419

CITATION

1

READS

118

8 authors, including:



Mehdi Mansour

University of Constantine 1

2 PUBLICATIONS 1 CITATION

SEE PROFILE



Mohammed Berkani

Higher School of Biotechnology Constantine

43 PUBLICATIONS 1,040 CITATIONS

SEE PROFILE



Samah Chaoua

Université Libre de Bruxelles

9 PUBLICATIONS 11 CITATIONS

SEE PROFILE



Flahaut S.

Université Libre de Bruxelles

47 PUBLICATIONS 1,840 CITATIONS

SEE PROFILE



Contents lists available at ScienceDirect

Sustainable Chemistry and Pharmacy

journal homepage: www.elsevier.com/locate/scp

Optimization of physicochemical parameters for lipopeptides surfactin production by *Bacillus halotolerans* under oat straw medium using Box-Behnken design and artificial neural networks

Mehdi Mansour^a, Mounira Kara Ali^{a,b}, Mohammed Berkani^{c,**}, Sigrid Flahaut^d, Sameh Chaoua^{a,d}, Hesam Kamyab^{e,f,g}, Yasser Vasseghian^{h,*}, Noreddine Kacem Chaouche^a

^a Laboratoire de Mycologie, de Biotechnologie et de l'Activité Microbienne (LaMyBAM), Département de Biologie Appliquée, Université des Frères Mentouri Constantine 1, Constantine, Algeria

^b Université M'hamed Bougara, Boumerdès, Algeria

^c Biotechnology Laboratory, Higher National School of Biotechnology Taoufik KHAZNADAR, nouveau Pôle universitaire Ali Mendjeli, BP. E66, Constantine, 25100, Algeria

^d Laboratoire de Microbiologie Appliquée, Université Libre de Bruxelles, Brussels, Belgium

^e Faculty of Architecture and Urbanism, UTE University, Calle Rumipamba S/N and Bourgeois, Quito, Ecuador

^f Department of Biomaterials, Saveetha Dental College and Hospital, Saveetha Institute of Medical and Technical Sciences, Chennai, 600 077, India

^g Process Systems Engineering Centre (PROSPECT), Faculty of Chemical and Energy Engineering, Faculty of Engineering, Universiti Teknologi Malaysia, Skudai, Johor, Malaysia

^h Department of Chemical Engineering and Material Science, Yuan Ze University, Taiwan

ARTICLE INFO

Handling Editor: Klaus Kümmerer

Keywords:

Bacillus halotolerans

Fusarium napiforme

Oat straw

Surfactin

ABSTRACT

The primary objective of this study was to produce lipopeptide surfactin using *Bacillus halotolerans* (GenBank accession: ON204239), which was isolated from the rhizosphere of pine trees in the El Baaraouia forest in Eastern Algeria. *B. halotolerans* demonstrated the capacity to biosynthesize surfactants when cultured on a blood agar medium, resulting in the formation of clear zones around the colonies. Antagonism tests were conducted using the culture supernatant on two liquid media: LB (Luria-Bertani) and a natural medium (OSM) with oats as the sole carbon source. The results showed significant inhibition zones (15 mm) on LB medium compared to larger zones (25 mm) on OSM after 24 h. In vivo, antagonistic activity under field conditions after 12 weeks revealed that *B. halotolerans* inoculated in OSM effectively enhanced and protected tomato plants against *F. napiforme* compared to the LB medium and the control group. The results exhibited notable differences in plant size, number of leaves, number of discolored leaves, and root mass, all favoring the OSM-inoculated plants. The study utilized a combination of Box-Behnken design within the response surface methodology (BBD-RSM), artificial neural networks (ANNs), and the genetic algorithm (GA) to optimize culture conditions and achieve maximum surfactin production. The optimal conditions for surfactin production included a substrate concentration of 7 g, incubation time of 30 h, pH of 2.31, and a temperature of 37.4 °C. Under these conditions, the antagonism test against phytopathogenic *F. napiforme* (GenBank accession: ON204349) using the culture supernatant revealed a significant inhibition zone of 18.5 mm after 24 h. UPLC-MS analysis of the lipopeptides produced by *B. halotolerans* cultured on an oat straw medium confirmed

* Corresponding author.

** Corresponding author.

E-mail addresses: m.berkani@ensbiotech.edu.dz (M. Berkani), vasseghian@saturn.yzu.edu.tw (Y. Vasseghian).

<https://doi.org/10.1016/j.scp.2023.101419>

Received 10 October 2023; Received in revised form 16 November 2023; Accepted 27 December 2023

Available online 10 January 2024

2352-5541/© 2024 Elsevier B.V. All rights reserved.

the production of various surfactin analogs. Seven analogs (C12, C13, C14, C15, C16, C17, and C18) were identified. Notably, the production of surfactin analogs by *B. halotolerans* in the Luria-Bertani medium yielded fewer analogs (C12, C13, C14, C15, and C16) in comparison. In summary, this study successfully optimized surfactin production conditions using BBD-RSM, ANNs, and GA, leading to enhanced antagonistic activity against *F. napiforme* and the identification of multiple surfactin analogs.

1. Introduction

Microorganisms are responsible for causing plant diseases, contributing to substantial agricultural losses, accounting for up to 40% of these losses (Khan et al., 2020). Among these microorganisms, phytopathogenic fungi are recognized as particularly menacing agents, as they are the causative agents behind numerous diseases afflicting various crops (Almeida et al., 2019). The overreliance on chemical pesticides to control these phytopathogens has resulted in excessive and indiscriminate use, leading to adverse repercussions (Rani et al., 2021).

Considering these issues, there is a growing emphasis on exploring alternative approaches to combat phytopathogenic fungi. Biocontrol agents represent a compelling alternative to traditional pesticides (Zhang et al., 2022). The application of biocontrol agents in biological pest management is considered a more sustainable and environmentally friendly option. This approach can help reduce the introduction of harmful chemical residues into the food chain, depending on the effectiveness of antagonistic organisms in curbing plant pathogens (Aragão et al., 2021).

Among the biocontrol agents, the *Bacillus* genus stands out as one of the most extensively researched and exploited groups due to its remarkable antagonistic capabilities. This genus has led to the development of various biological control products that are now commercially available (Yuan et al., 2022).

Lipopeptides are synthesized by various species of the *Bacillus* genus, and it's noteworthy that a single strain can concurrently produce multiple lipopeptide families (Labiadh et al., 2021). These compounds have gained recognition as natural agents for biological pest control, providing a more environmentally friendly alternative to chemical pesticides. The extensive use of chemical pesticides often leads to environmental problems, including the development of pest resistance and contamination issues (Torres et al., 2017).

Bacillus lipopeptides encompass three primary families, namely iturin, surfactin, and fengycin (Dimkić et al., 2013). Surfactins belong to the lipopeptide group and are characterized by shared structural attributes, although they exhibit significant structural diversity. This diversity is primarily attributed to variations in the amino acid composition within the peptide chain and differences in the length and isomeric forms of the lipidic chain (Théâtre et al., 2021). Remarkably, the natural production of surfactins can result in the formation of over a thousand variants, a diversity stemming from their intricate biosynthetic process (Zhi et al., 2017).

The objective of this study is to optimize four key parameters (pH, substrate concentration, temperature, and incubation time) to enhance the antagonistic effectiveness of *B. halotolerans* inoculated on an oat straw medium against the phytopathogen *F. napiforme*. Oat straw was selected as the substrate for various reasons. Firstly, due to its richness in lignocellulosic biomass known for its resistance to degradation. Additionally, oat straw is widely available in large quantities at the national level, particularly in Algeria. This choice aligns with sustainability goals, emphasizing the use of a natural medium (OSM) with oats as the sole carbon source, promoting environmentally friendly practices.

The study's efforts contribute to sustainable agriculture through the implantation of biocontrol methods. The selection of oat straw as a substrate also reflects a commitment to utilizing renewable resources, further supporting the overall goal of environmentally conscious research and development. The unique aspect of our approach lies in the combination of Response Surface Methodology (RSM) and ANNs, making it a powerful strategy to address this challenge.

RSM, a statistical method employed in this research, allows for a systematic exploration of multiple variables through a series of controlled experiments (Bouchareb et al., 2014; Rabahi et al., 2018). It is valued for its ability to reveal intricate relationships within a defined parameter space using a straightforward polynomial model. RSM has a broad range of applications, including optimizing extraction processes (Jiang et al., 2014).

In addition to RSM, we harness the potential of ANNs to model and predict complex, multi-dimensional data (Rajasekaran et al., 2022). ANNs are inspired by the human nervous system, and they learn and adapt from experiences and errors. Unlike traditional statistical methods, ANNs have the capacity to autonomously process intricate information (Raj et al., 2023). They have been employed successfully for predicting ecofriendly of natural dye extraction (Aftab et al., 2024).

It's important to note that while ANNs provide valuable insights, they do not guarantee the identification of the ultimate global solution, as pointed out by previous studies (Dragoi and Vasseghian, 2021; Bouizzar et al., 2023). In ANNs, individual computational units are often referred to as artificial neurons, which have been a subject of exploration (Vasseghian et al., 2021).

To enhance the optimization process and reduce the complexity of ANNs, we integrate the Genetic Algorithm (GA), a powerful evolutionary and adaptive optimizer. GAs draw inspiration from genetic evolution principles, employing operations such as selection, mutation, inversion, and crossover over multiple generations to identify optimal operational parameters. This integrated approach demonstrates effective performance (Fan et al., 2018).

We assess the predictive accuracy and modeling effectiveness of both RSM and ANNs using metrics like the correlation coefficient (R^2) and the absolute error. Additionally, we employ Analysis of Variance (ANOVA) and sensitivity analysis to determine the relative significance of the input variables. This combination of RSM, ANNs, and GA offers a comprehensive and effective approach to optimizing antagonistic activity in this bioprocess.

2. Material and methods

2.1. Molecular identification of *Bacillus* strain

The *Bacillus* strain was isolated from the rhizosphere of pine trees in the El Baaraouia forest located in the Eastern region of Algeria. Molecular identification was carried out using 16S rDNA sequencing, following the protocol provided by the GENE LIFE SCIENCES Laboratory in Sidi Bel Abbes, Algeria.

2.2. Molecular identification of *Fusarium* phytopathogenic

The phytopathogenic *Fusarium* agent, provided by the Laboratory of Mycology, Biotechnology and Microbial Activity, was identified through ITS DNA sequence analysis. This analysis followed the protocol recommended by the GENE LIFE SCIENCES Laboratory in Sidi Bel Abbes, Algeria. DNA extraction was carried out using the NucleoSpin Plant II commercial kit from Macherey-Nagel in Germany.

2.3. Production of biosurfactant by *B. halotolerans*

Hemolytic activity was carried out as described by (Carrillo et al., 1996) with a few modifications. *B. halotolerans* was inoculated on a blood agar base medium with 5% of blood and incubated at 30 °C for 48 h. The clear zone around a colony confirmed the production of biosurfactants (Ghasemi et al., 2019).

2.4. Antagonist test in vitro using culture supernatant of two medium (Luria-Beratani (LB) and oat straw medium (OSM))

2.4.1. Preparation of oat straw

The oat straw variety used in this work was provided to eastern Algeria, the choice of this substrate is justified by its abundance at the national level and particularly rich in lignocellulosic biomass. This substrate is therefore favorable for *Bacillus* growth. A quantity of oat straw was crushed with a mill and then put into a sieve to remove a large particle.

To carry out the antagonist test using the culture supernatant, two fermentation medium were proposed: the synthetic medium (LB) and the natural medium based on oats as the only carbon source (OSM). For this purpose, two fermentation medium are performed: First a preculture, by taking young colonies aged 18–24 h, then incubated in a 250 mL flask containing 100 mL of LB culture medium and incubated at 30 °C for 18h. 10 mL of this preculture was added to 500 mL flasks containing 200 mL of liquid LB culture medium and OSM separately. The cultures were incubated for 72 h at 30 °C at 180 rpm.

After fermentation, and to test the antifungal activity of the supernatants, the culture was centrifuged at 6000 rpm for 20 min to separate the cells from the culture medium supposed to contain the bioactive molecules. The obtained supernatant was filtered through sterile millipore filters of 0.22 µL diameter. To perform this test, fungal suspensions of *F. napiforme* of 5×10^5 spore/mL were spread with a sterile swab on Petri dishes containing Sabouraud agar. After drying (about 5 min), 6 mm diameter discs of Wattman paper soaked with 10 µL of the extract to be tested, were dried, and placed on the surface of the plates. The latter are placed at 4 °C in a refrigerator for 2 h to allow a pre-diffusion of the bioactive substances, then incubated at 30 °C for 3 days (Tagg and McGiven, 1971).

2.5. In vivo field antagonist test

The field trials were carried out on the experimental field of Chaab-arssas (Frères Mentouri - Constantine 1- University, Algeria) during the period of June to September 2021. The field was divided into several plots, each with an area of 1 m² separated from each other by 0.6 m, potting soil was added to each plot and wells were formed (18 wells/plot) for transplanting into the tomato plants. The roots of the tomato plants of the Louisa Royale variety aged between 4 and 5 weeks were immersed in 10 mL of the *Fusarium* spore suspension for 10min. They were then immersed again in 10 mL of bacterial suspension. Untreated tomato plants served as a control.

After 12 weeks of incubation, eight parameters were studied: Plant size, number of leaves, number of discoloured leaves, number of flowers, number of fruits, weight of fruit, number of plants grown, and root mass were studied.

The statistical study was carried out with the Minitab 18 software developed by Minitab, Inc. for the Windows operating system only. The analysis of variance ANOVA was used for this study. All the studied parameters in the presence of *B. halotolerans* on both OSM and LB medium showed a statistically significant positive effect ($P < 0.05$).

2.6. Factors selection

Four independent variables were selected (pH, substrate concentration, temperature, and incubation time). Table S1 shows the domain of study with coded levels and real values of studied variables. The Box Behnken Design matrix represented in coded units for the four independent variables is illustrated in Table S2.

2.7. Box-Behnken design of response surface methodology

The study initially focused on four specific parameters: pH, substrate concentration, temperature, and incubation time. To analyze these factors, RSM with the Box-Behnken design (BBD) was applied, following the approach outlined by Lanka and Latha in 2015 (Lanka and Latha, 2015). The optimization and mathematical correlation of the independent variables were conducted using the Minitab 19.0 statistical software package. The BBD within the RSM framework required a total of twenty-eight experiments for the 4-factor design, which included four central points. Each factor was assessed at three different levels, denoted as -1, 0, and +1. Each ex-

periment was replicated three times, and the responses were fitted to separate second-order polynomial models, as expressed in Eq. (1).

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i x_i + \sum \beta_{ii} x_i x_i + \sum \beta_{ij} x_i x_j \quad (1)$$

The correlation between the coded value x_i and the actual value X_i , representing the independent variable, is expressed as follows in Eq. (2):

$$x_i = \frac{X_i - X_0}{\delta X} \quad (2)$$

The coefficient of determination (R^2), in addition to the adjusted R^2 , was used for statistical assessment to quantify the accuracy and confirm the dependability of the polynomial model equation.

2.8. Antagonism test in vitro

Different concentrations of oat straw (1, 4, and 7g) were distributed in a 500 mL Erlenmeyer with a ratio of 250 mL per flask, the pH was adjusted with the values of 4, 7.5 and 11). All preparations were autoclaved at 120 °C for 20 min the pre-culture was obtained by inoculating colonies of *Bacillus* in 250 mL shake flasks containing 100 mL of LB medium and incubated at 30 °C for 18h. The Erlenmayer were inoculated by 10 mL of *B. halotolerans*, pre-culture was incubated at different temperature (25, 40 and 50 C°) at different time of incubation (16, 32 and 48 h). The factors varied according to the design of the experiment as presented in Table 1. All cultures were incubated with 180 rpm agitation.

After fermentation, 50 mL of each Erlenmayer was centrifuged at 6000 rpm for 20 min to separate the cells from the culture medium supposed to contain the bioactive molecules. The obtained supernatant was filtered through sterile millipore filters of 0.22 µL diameter. To perform this test, fungal suspensions of *Fusarium* (5×10^5 spore/mL), were spread with a sterile swab on Petri dishes containing Sabouraud agar. After drying (about 5 min), 6 mm diameter discs of Wattman paper soaked with 10 µL of the extract to be tested, were dried, and placed on the surface of the plates. The latter is placed at 4 °C in a refrigerator for 2 h to allow a prediffusion of the bioactive substances and then incubated at 30 °C for 3 days (Tagg and McGiven, 1971).

2.9. Validation of the antagonist test

To validate the optimized conditions, two experiments were conducted using 500 mL shake flasks with a 250 mL working volume. In the first experiment, the factors were set as follows: 7g of oats, pH 3.4, a temperature of 37.43 °C, and an incubation time of 30 h. In the second experiment, the factors were adjusted to 7g of oats, pH 2.31, a temperature of 37.4 °C, and a culture time of 30 h.

2.10. Machine learning assisted optimization of antagonistic activity

In ANNs, there are typically three distinct layers: the input layer, hidden layer(s), and the output layer, each composed of multiple neurons. Building an ANN model involves various stages, including the training phase, which consists of input feed-forward multi-layer processing and error backpropagation, followed by the validation phase. To create and train an ANN model using the previously mentioned BBD data, we employed either the feed-forward backpropagation (BP) or the Levenberg-Marquardt (trainlm) algorithm. However, as recommended by (Maji et al., 2014), we expanded the dataset to include 200 data points generated from a second-order polynomial equation. This expansion was necessary because the experimental data from the BBD alone was insufficient to create an optimal network architecture. The validation process was conducted to ensure the reliability of the model developed during the training phase. The model is considered suitable for future applications only if the validation results align with the expected outcomes.

2.11. Artificial neural network modeling

At this stage, a standard input feed-forward multilayer Artificial Neural Network (MLP) was utilized along with an ANN training algorithm for modeling. MLPs are renowned for their adaptability in approximating physicochemical processes and are widely employed for this purpose (Jasso-Salcedo et al., 2017). Typically, the connections within the network are represented by bias and weights. In addition to defining the network's topology, selecting internal parameters is guided by empirical data to achieve the best

Table 1

Comparison between the effect of *B. halotolerans* (OSM) and *B. halotolerans* (LB medium) on tomato plants against the phytopathogen *F. napiforme* after 12 weeks incubation in the field conditions.

Parameters	<i>B. halotolerans</i> (OSM)	<i>B. halotolerans</i> (LB medium)	Control
Average plant size (cm)	52 ± 20	24 ± 13	16 ± 14
Average number of leaves	68 ± 8	56 ± 10	34 ± 25
Average number of discoloured leaves	52 ± 13	59 ± 15	80 ± 12
Average number of flowers	20 ± 6	18 ± 12	13 ± 6
Average number of tomatoes grown	6	4	1
Average weight of tomatoes (g)	32 ± 14	27 ± 13	10
Number of plants grown	16	8	4
Average root mass (g)	80 ± 26	70 ± 14	49 ± 25

possible ANN performance. To identify the crucial parameters of the ANN and the optimal number of hidden neurons, approximately 11 different training algorithms were used in conjunction with a five-fold cross-validation strategy.

The inputs for the current process consist of pH (X_1), substrate concentration (X_2), temperature (X_3), and incubation time (X_4), with the system's output being the yield of antagonistic activity. We opted for two hidden layers, each with a neuron count ranging from 1 to 10.

Table S3 provides a summary of the design parameters used in developing the current ANN model.

The signals emitted by the hidden layer are represented in terms of weights and thresholds through a transfer function, as described in Eq. (3). Furthermore, the signals transitioning from the hidden layer to the output layer constitute the predicted value, which can be expressed using Eq. (4).

$$x_j = F \left(\sum_{i=1}^n x_i \times w_{ij} + P_j \right) \quad (3)$$

$$y_{i-pred} = F' \left(\sum_{j=1}^n v_j \times x_j + Q \right) \quad (4)$$

In this context, x_i represents the input values, while P_j stands for the hidden neuron values. To prevent numerical overflows due to excessively large or small weights, all training values for the ANN model were normalized between 0 and 1 using the min-max method, as expressed in Eq. (5).

$$x_i = \frac{X_i - X_{\min}}{X_{\max} - X_{\min}} \quad (5)$$

Here, X_i represents the normalized value of X , while X_{\min} and X_{\max} denote the minimum and maximum values of X in its original scale.

After the training phase, the BP algorithm undergoes iterations of error backpropagation to minimize the mean squared error (MSE) between experimental and simulated output data. During this process, it continually adjusts the weights and biases among neurons. To evaluate the accuracy of the ANN model's predictions in comparison to the actual targets, performance indices, such as the MSE (as described in Eq. (6)) and the determination coefficient (R^2) (as described in Eq. (7)), were employed. These metrics were used to develop an optimal ANN model (Wu et al., 2021).

The determination of the number of hidden neurons with a focus on minimizing the MSE. Subsequently, optimal network architecture was chosen, considering the dual criteria of minimizing the MSE and maximizing R-values. This choice aimed to reduce the overfitting of the data and enhance the accuracy and predictability of the model's outputs (Thomas et al., 2021).

$$MSE = \sum_{i=1}^n \frac{(y_i - y_{i-pred})^2}{n} \quad (6)$$

$$R^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (y_i - y_{i-pred})^2}{\sum_{i=0}^n (y_{i-av} - y_{i-pred})^2} \quad (7)$$

The calculation for the hidden neuron weight (W_j) is provided by Eq. (8), which is presented as follows:

$$W_j = \sum_{i=1}^k w_{ij} x_i \quad (8)$$

Likewise, the calculation for the output neuron weight (W_k) is determined by Eq. (9):

$$W_k = \sum_{j=1}^z w_{jk} x_j \quad (9)$$

The predicted output is generated by the activation function, utilizing the neuron's weight in either the hidden or output layer, as described in Eq. (10):

$$y = f(W + B) \quad (10)$$

To assess the influence of connection weights and the relative impact of input factors on the output, sensitivity analysis was conducted using the Garson algorithm (Wang et al., 2023). This analysis involved the application of the Garson equation (Eq. 11) and the exploration of various potential combinations of variables (Ayodele et al., 2021).

$$Q_{ik} = \frac{\sum_{j=1}^L \left(\frac{|w_{ij}|}{\sum_{i=0}^n |w_{rj}|} |v_{jk}| \right)}{\sum_{i=0}^N \left(\sum_{i=0}^n \left(\frac{|w_{ij}|}{\sum_{i=0}^n |w_{rj}|} |v_{jk}| \right) \right)} \quad (11)$$

The optimization process using the genetic algorithm employs an AI-driven stochastic nonlinear optimization approach that simulates natural selection and genetic processes. Genetic algorithms (GAs) are instrumental in preventing models from becoming trapped in local optima (Samuel Ratna Kumar et al., 2023). They achieve this by selecting suitable initial weights and thresholds for an existing ANN model and incorporating them into fitness function (as described in Eq. (12)). The fitness function can be expressed as follows:

$$F = \text{Purelin}(JW * \tan \text{sig}(KW * [x_1; x_2; x_3; x_4] + b_j) + b_k) \quad (12)$$

The Genetic Algorithm (GA) begins by generating an initial population of solutions, using parameters such as initial operating pH, substrate concentration, temperature, and incubation time as optimization inputs (Table S4).

2.12. Identification of lipopeptides (surfactin)

B. halotolerans was cultured in agitated flasks at 180 rpm using two different culture media: the optimal medium and LB medium. After cultivation, the cultures underwent centrifugation at 15,000 rpm for 20 min. Following this, supernatant samples were applied to C18 solid-phase extraction cartridges, and lipopeptides were eluted with 100% acetonitrile (ACN). Subsequently, the samples were analyzed using a reverse-phase UPLC system coupled with a single quadrupole mass spectrometer (UPLC MS (SQD), Waters Acquity H-Class), equipped with a Waters Acquity UPLC BEH C18 column (1.7 μm , 2.1 \times 50 mm) and a column guard.

The mobile phase in this research consisted of a mixture of water (A) and acetonitrile (B), both acidified with 0.1% formic acid. The flow rate was consistently maintained at 0.6 mL/min, and the column temperature was held at 40 °C. The gradient profile spanned 7 min: starting with 70% water and 30% ACN, shifting to 5% water and 95% ACN at 5.20 min, and maintaining this ratio from 5.20 to 7 min to condition the column. Lipopeptide compounds were identified based on the retention times of purified standards. Each lipopeptide was subsequently characterized, referencing a Single Quadrupole Mass Detector (SQD). The analysis temperature was set at 130 °C, the desolvation temperature at 400 °C, the nitrogen flow rate for desolvation was 1000 l/h, and the cone voltage was set to 50 V.

3. Results and discussion

3.1. Identification of the bacterial strain

Preliminary identification of the bacterial strain by macroscopic and microscopic observation and a catalase test showed that it belongs to the Gram + group of bacteria. The sporulation test showed that the bacterial strain belongs to the genus *Bacillus*. Molecular identification (by the 16S rDNA sequence of the bacterial strain were compared to the 16S rDNA sequences in the GenBank database. The sequences were 99% similar. Thus, according to the sequence comparison, the bacterial strain is *B. halotolerans* (ON204239).

3.2. Molecular identification of phytopathogenic strain

Preliminary identification of the phytopathogenic strains by macroscopic and microscopic observation showed that they belong to the genera *Fusarium*. Molecular identification by *ITS* rDNA gene sequences of *Fusarium* sp after correction and comparison with previously published sequences in GenBank were 99% like those of *F. napiforme* (ON204349).

3.3. Biosurfactants production

After 48 h of incubation, *B. halotolerans* showed its capacity to produce biosurfactants, resulting in the appearance of clear zones around the colonies (Fig. 1). These results are in line with those of Carrillo et al. (1996) who demonstrated a relationship between hemolytic activity and surfactant production (Carrillo et al., 1996). These results are also like those found by Al-Dhabi et al. (2020) who showed that bacteria have the capacity to produce biosurfactants, in particular the genus *Bacillus* (Al-Dhabi et al., 2020).

3.4. Study of antagonistic activity using the culture supernatant

The results of the antagonist test using the culture supernatant after fermentation (0h, 24h, 48h, and 72h) on the above-mentioned culture media against fungal phytopathogen show that the inhibition zones differ from one culture medium to another and depend on the incubation time. In fact, the most important zones of inhibition by *B. halotolerans* towards *F. napiforme* were obtained with the discs impregnated by the culture medium supernatant (OSM) with diameters of 25 mm after 24 h (Fig. 2). *B. halotolerans* inoculated on a liquid medium with oats straw as the only carbon source showed a very interesting inhibition effect on pathogens in comparison

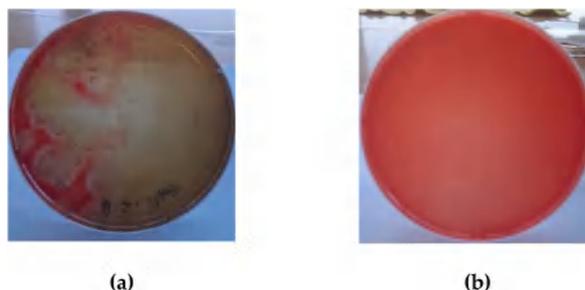


Fig. 1. Production of biosurfactant (a) by *B. halotolerans* on blood agar medium; (b) the control.

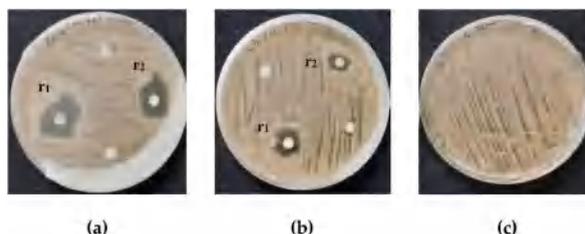


Fig. 2. Antagonistic activity of *B. halotolerans* against *F. napiforme* using culture supernatant: (a) OSM, (b) LB medium, and (c) Control.

with *B. halotolerans* inoculated on LB medium. *Bacillus* species are renowned for their significant antifungal capabilities, characterized by the production of a range of potent metabolites and hydrolytic enzymes, as observed in the study by (Rahman et al., 2007). Within this genus, multiple bacterial species have been identified as producers of active lipopeptides, as noted by (Fira et al., 2018).

3.5. In vivo test on field condition

3.5.1. Antagonist test in vivo

The effect of the *B. halotolerans* strain (inoculated on OSM and LB medium) on tomato plants in conferring protection against the phytopathogen *F. napiforme* was studied under field conditions.

After 12 weeks of incubation, a comparison was made between the antagonistic effect of *B. halotolerans* incubated on OSM and LB medium against *F. napiforme* (Fig. S1 and Table 1).

The average root mass (antagonist) is equal to 102 g in the OSM medium, 89 g in the LB medium and 44 g for the control (Fig. S2 and Table 1).

It might be noted that all the fruits grown on the batches treated with *B. halotolerans* whether on OSM and LB medium were healthy compared to the control samples treated only with the phytopathogen *F. napiforme* (Fig. S3 and Table 1).

In the field, tomato seedlings treated with *B. halotolerans* (inoculated on OSM and LB medium) after 12 weeks of inoculation were resistant to *F. napiforme* compared to seedlings treated with phytopathogen only. These results are in good agreement with those reported by (Ajillogba et al., 2013). They have shown that tomato plants treated with *Bacillus* spp were 75% protected from *Fusarium* induced disease compared to the control. In previous studies, *Bacillus* spp has shown significant reductions in the incidence of various diseases through several mechanisms (Kloepper et al., 2007).

The protection conferred by *Bacillus* spp may be based on the production of secondary metabolites (antibiotics, volatile and non-volatile compounds) by colonizing the root surface, causing inhibition of the fungal mycelium, and thereby improving plant growth (Janga et al., 2017).

3.6. Influential factors screen using Box-Banken design

The antagonistic activity of *B. halotolerans* against the phytopathogen *F. napiforme* is influenced by physico-chemical parameters. Indeed, in the present study, the pH, temperature, substrate concentration, and incubation time were supposed to optimize the antagonistic activity of *B. halotolerans* using the BBD.

The outcomes derived from various experiments establish a correlation that reveals the impact of pH (X_1), substrate concentration (X_2), temperature (X_3), and culture time (X_4) on the response variable. This correlation is generated using Minitab 19 software and is represented by the following second-order polynomial equation (Eq. (13)).

$$Y = 17,75 - 1,417X_1 + 1,333 X_2 - 1,917 X_3 - 1,667 X_4 - 5,96 X_1 X_1 - 0,33 X_2 X_2 - 5,71 X_3 X_3 - 6,08 X_4 X_4 - 0,50 X_1 * X_2 - 0,75 X_1 * X_3 - 0,00 X_1 * X_4 - 0,00 X_2 * X_3 + 0,50 X_2 * X_4 + 0,50 X_3 * X_4 \quad (13)$$

ANOVA, a widely used statistical tool, was employed to assess the model's suitability, and the results are summarized in Table S5. The coefficient of determination, labeled as R^2 , functions as a metric to validate the model's precision and how well it fits the data,

usually falling within the range of 0–1. An R^2 value approaching 1 indicates strong predictive power. Researchers often suggest that an R^2 value of 0.80 or higher indicates a well-fitting model, as noted by (Vasseghian and Dragoi, 2018).

In this study, the practical values closely matched the expected values, resulting in an R^2 value of 0.812, signifying that 81.20% of the variations in antagonistic activity could be explained by the independent variables.

The Fisher value, denoted as 'F' (F-value = $SS2r/SS2e$), represents the ratio of the mean square of the model to the residual error and is a valid measure of how well the factors describe the variation in the data. In the ANOVA results (Table S5), the 'F' value (F-value = 4.01) and the low probability p-value ($p = 0.008$). Typically, a low P-value associated with the F-value signifies the high significance of the regression model. The adequacy of the model can also be evaluated by considering the regression coefficients of the factors presented in Table S3, which includes information such as their standard errors, statistics, and corresponding P-values.

3.7. Response surface

The graphical representations, such as the 3D response surface plots, were generated to enhance our understanding of the relationships among the four tested variables and to identify the optimal parameters for achieving the highest level of antagonistic activity in *B. halotolerans* (Figs. S4–S9)

3.8. Process modeling using ANNs-GA

The main goals of this study involve creating a robust artificial neural networks (ANNs) model for enhancing the antagonistic activity generated by *B. halotolerans*, all while minimizing the average error between the real and predicted output values.

In this investigation, we employed the tangent-sigmoidal transfer function for the hidden layer nodes and the pure-linear transfer function for the output layer nodes. These functions outperformed others, resulting in the lowest Mean Squared Error (MSE) and the highest R^2 values. The selection of an appropriate number of hidden neurons was made with careful consideration, as it significantly influences simulation performance and the optimal network architecture, as noted in previous studies by (Dhanarajan et al., 2014). A low number of neurons can slow down the modeling process, while an excessive number can lead to overfitting, absorbing noise in the data used for training and thereby reducing the robustness and generalizability of the model (Fan et al., 2018).

To determine the optimal number of hidden neurons, we employed a 'trial-error minimization' approach (Wang et al., 2022). This approach involves comparing the network's calculated error with the desired output and continuously adjusting the weights and biases of the training network until the lowest Mean Squared Error (MSE) achievable for a specific number of hidden neurons is reached.

3.9. Model validation

To identify the optimal conditions for maximizing antagonistic activity across the four factors, we leveraged the ANN-GA feature. The mathematical model yielded the following optimal experimental parameters: pH of 2.31, substrate concentration of 7 g, temperature at 37.4 °C, and an incubation time of 30 h. The highest anticipated or forecasted outcome achieved under these optimized culture conditions for antagonistic activity was 19.21 mm, which closely matched the experimental value of 18.50 mm. This close alignment between predicted and experimental values confirms the successful validation of the model. Furthermore, the sequential optimization strategy demonstrated its effectiveness in determining the best procedural conditions, as detailed in Table 2.

Thus, the combination of Artificial Neural Network and Genetic Algorithm (ANN-GA) stands out as a superior model in terms of predictive accuracy compared to the Response Surface Methodology (RSM)-Box-Behnken Design (BBD) model. The complex and multifaceted nature of lipopeptide surfactin production involves intricate relationships among various physicochemical factors. The ANN-GA model, harnessing the power of neural networks and genetic optimization, adeptly captures the non-linear interactions and nuances of the system. This underscores the effectiveness of the ANN-GA approach in optimizing parameters for enhanced lipopeptide surfactin production in a challenging medium such as oat straw.

3.10. Surfactin production

Lipopeptide analysis by UPLC-MS showed that *B. halotolerans* has the capacity to produce lipopeptides surfactin of seven analogs (C12, C13, C14, C15, C16, C17, and C18) in significant quantities on a medium based on oats straw as the sole carbon source with a higher proportion of the C15 and C16 analogs than the other analogs produced (Fig. 3). On LB medium surfactin production was also

Table 2
Factors configuration with the predicted and experimental response values.

Factors	Actual value of predicted optimum	Predicted max. Y value (mm)	Desirability	Experimental Y value (mm)
RSM-BBD		19.11	1	18
pH	3.4			
Substrate concentration	7			
Temperature	37.43			
Incubation time	30			
ANN-GA		19.21		18.5
pH	2.31			
Substrate concentration	7			
Temperature	37.4			
Incubation time	30			

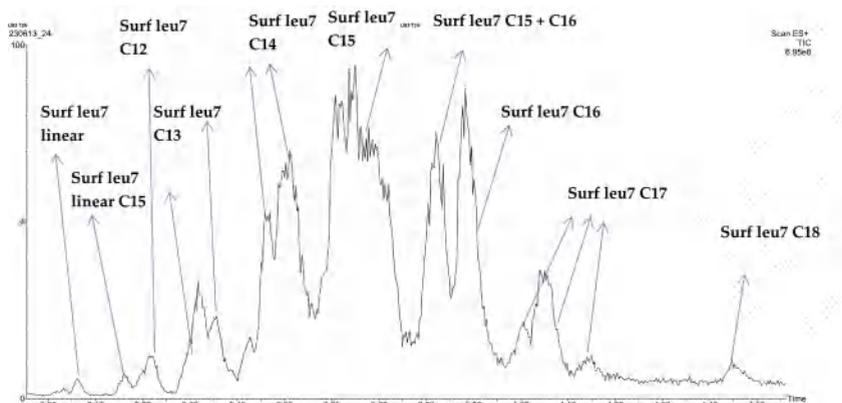


Fig. 3. Chromatograms corresponding to surfactin produced by *B. halotolerans* on optimum medium analyzed by UPLC/MS technique.

observed, but less than on oat straw medium, with only five analogs appearing (C12, C13, C14, C15, and C16) with a higher proportion of the C15 than the other analogs produced (Fig. 4). These results agree with those obtained by (Biniarz et al., 2017) and (Janek et al., 2021) who showed that the bacteria of the genus *Bacillus* could produce lipopeptides biosurfactant. These results also join those of (Tsalgatidou et al., 2023) who have demonstrated the ability of *B. halotolerans* to produce biosurfactant analogs. The results obtained in this study are also consistent with those of other studies in particular those of [42] have tested the ability of several species of the *Bacillus* genus to produce surfactants (Duarte et al., 2023). These showed a very good production of different surfactant analogs up to C18. To our knowledge, *Bacillus halotolerans* is the first strain to produce lipopeptides biosurfactants on an oat medium as the sole carbon source. Fig. S2 shows a superposition of the chromatographs obtained for surfactin produced on an optimized medium based on oat straw as the sole carbon source and on LB medium. The results show that *B. halotolerans* inoculated on a natural medium produced a greater quantity of surfactin with different analogs compared with *B. halotolerans* inoculated on an LB medium. Fig. S3 represents the mass spectra of some analogs surfactin produced by *B. halotolerans*.

Finally, it is essential to note that this study contributes to the bioeconomic aspect by optimizing surfactin production conditions using sustainable practices, aligning with the United Nations Sustainable Development Goals (UN SDGs). The emphasis on environmentally friendly substrates, such as oat straw, reflects a commitment to sustainable resource utilization. Additionally, the enhanced antagonistic activity against *F. napiforme* supports the social aspect of work by promoting healthier and more resilient crop systems, positively impacting agriculture and communities. Furthermore, the identification of multiple surfactin analogs showcases the potential for novel antimicrobial substances through the synergistic effects of these analogs. In the face of antimicrobial resistance and drug shortages, the study's findings underscore the importance of exploring alternative and sustainable solutions for agricultural and medical applications. The integration of biocontrol methods and the discovery of diverse surfactin analogs contribute to the broader effort to address global challenges in agriculture and public health.

4. Conclusion

In this study, *B. halotolerans* (ON204239), inoculated on oat straw medium as the sole carbon source, demonstrated a significant inhibitory effect against the phytopathogen *F. napiforme* (ON204349) *in vitro*. This effect was further confirmed *in vivo* under field conditions, providing tomato plants with substantial protection against *F. napiforme*, in comparison with the results obtained by inoculating *B. halotolerans* on LB medium. For the optimization of fermentation conditions to produce lipopeptide surfactin by *B. halotolerans*, we employed the ANN-GA model. The optimized fermentation conditions included a pH of 2.31, a substrate concentration of 7 g,

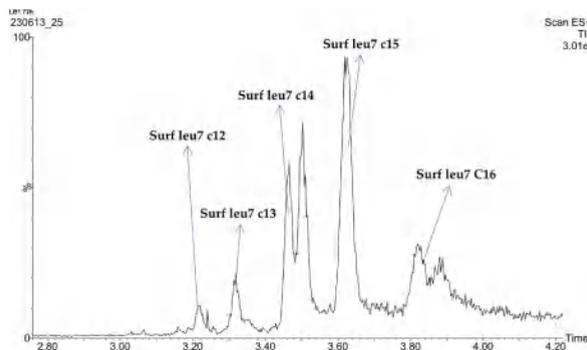


Fig. 4. Chromatograms corresponding to surfactin produced by *B. halotolerans* on LB medium analyzed by UPLC/MS technique.

a temperature of 37.4 °C, and an incubation time of 30 h. The results obtained under these optimized conditions surpassed those achieved under standard conditions.

Furthermore, oat straw was identified as a suitable substrate for enhancing the production of surfactin by *B. halotolerans*. The findings revealed a higher yield of surfactin when *B. halotolerans* was incubated on an oat straw medium as the sole carbon source, compared to an LB medium.

CRedit authorship contribution statement

Mehdi Mansour: Data curation, Formal analysis, Methodology, Software, Validation, Writing – original draft. **Mounira Kara Ali:** Formal analysis, Validation, Writing – original draft. **Mohammed Berkani:** Conceptualization, Project administration, Validation, Writing – original draft, Writing – review & editing. **Sigrid Flahaut:** Formal analysis, Validation, Writing – original draft. **Sameh Chaoua:** Formal analysis, Validation, Writing – original draft. **Hesam Kamyab:** Conceptualization, Project administration, Validation, Writing – original draft, Writing – review & editing. **Yasser Vasseghian:** Conceptualization, Project administration, Validation, Writing – original draft, Writing – review & editing. **Noreddine Kacem Chaouche:** Formal analysis, Validation, Writing – original draft.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Data availability

Data will be made available on request.

Acknowledgements

A grateful thank to Romain THOMAS, Institut de recherche TERRA, Gembloux, Belgium and Bertrand CORNU, Institut de recherche LABIRIS, Bruxelles, Belgium.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.scp.2023.101419>.

References

- Aftab, M., Ahmad, T., Adeel, S., Javed, M., 2024. Ecofriendly process optimization of natural dye extraction from clove (*Syzygium aromaticum* L.) using response surface methodology and artificial neural network modeling. *Sustain. Chem. Pharm.* 37, 101401.
- Ajillogba, C.F., Babalola, O.O., Ahmad, F., 2013. Antagonistic effects of *Bacillus* species in biocontrol of tomato Fusarium wilt. *Stud. Ethno-Med.* 7, 205–216.
- Al-Dhabi, N.A., Esmail, G.A., Valan Arasu, M., 2020. Enhanced production of biosurfactant from *Bacillus subtilis* strain Al-Dhabi-130 under solid-state fermentation using date molasses from Saudi Arabia for bioremediation of crude-oil-contaminated soils. *Int. J. Environ. Res. Publ. Health* 17, 8446.
- Almeida, F., Rodrigues, M.L., Coelho, C., 2019. The still underestimated problem of fungal diseases worldwide. *Front. Microbiol.* 10, 214.
- Aragão, T.M., dos Santos, J.V., Santos, T.S., Souto, E.B., Severino, P., Jain, S., da Costa Mendonça, M., 2021. Scientific-technological analysis and biological aspects of entomopathogenic fungus *Aschersonia*. *Sustainable Chemistry and Pharmacy* 24, 100562.
- Ayodele, B.V., Alsaif, M.A., Mustapa, S.I., Cheng, C.K., Witoon, T., 2021. Modeling the effect of process parameters on the photocatalytic degradation of organic pollutants using artificial neural networks. *Process Saf. Environ. Protect.* 145, 120–132.
- Biniarz, P., Lukaszewicz, M., Janek, T., 2017. Screening concepts, characterization and structural analysis of microbial-derived bioactive lipopeptides: a review. *Crit. Rev. Biotechnol.* 37, 393–410.
- Bouchareb, M.K.e., Bouhelassa, M., Berkani, M., 2014. Optimization of photocatalytic decolorization of CI Basic Blue 41 in semi-pilot scale prototype solar photoreactor. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 89, 1211–1218.
- Bouizzar, S., Berkani, M., Kebaili, F.F., Barceló, D., Joo, S.W., Vasseghian, Y., Khenaka, K., 2023. Dicamba degradation using a low-cost chlorine/ferrous-based AOP: ANN-PSO model development, intermediate identification, and toxicity assessment using microalgae. *Indus. Eng. Chem. Res.* 62 (33), 12891–12903.
- Carrillo, P., Mardaraz, C., Pitta-Alvarez, S., Giulietti, A., 1996. Isolation and selection of biosurfactant-producing bacteria. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 12, 82–84.
- Dhanarajan, G., Mandal, M., Sen, R., 2014. A combined artificial neural network modeling–particle swarm optimization strategy for improved production of marine bacterial lipopeptide from food waste. *Biochem. Eng. J.* 84, 59–65.
- Dimkić, I., Živković, S., Berić, T., Ivanović, Ž., Gavrilović, V., Stanković, S., Fira, D., 2013. Characterization and evaluation of two *Bacillus* strains, SS-12.6 and SS-13.1, as potential agents for the control of phytopathogenic bacteria and fungi. *Biol. Control* 65, 312–321.
- Dragoi, E.-N., Vasseghian, Y., 2021. Modeling of mass transfer in vacuum membrane distillation process for radioactive wastewater treatment using artificial neural networks. *Toxin Rev.* 40, 1526–1535.
- Duarte, I.O., Hissa, D.C., Quintela, B.C.S.F., Rabelo, M.C., Oliveira, F.A.d.S., Lima, N.C.B., Melo, V.M.M., 2023. Genomic analysis of surfactant-producing *Bacillus vallismortis* TIM68: first glimpse at species pangenome and prediction of new plipastatin-like lipopeptide. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 195, 753–771.
- Fan, M., Hu, J., Cao, R., Ruan, W., Wei, X., 2018. A review on experimental design for pollutants removal in water treatment with the aid of artificial intelligence. *Chemosphere* 200, 330–343.
- Fira, D., Dimkić, I., Berić, T., Lozo, J., Stanković, S., 2018. Biological control of plant pathogens by *Bacillus* species. *J. Biotechnol.* 285, 44–55.
- Ghasemi, A., Moosavi-Nasab, M., Setoodeh, P., Mesbahi, G., Yousefi, G., 2019. Biosurfactant production by lactic acid bacterium *Pediococcus dextrinicus* SHU1593 grown on different carbon sources: strain screening followed by product characterization. *Sci. Rep.* 9, 5287.
- Janek, T., Gudiña, E.J., Polomska, X., Biniarz, P., Jama, D., Rodrigues, L.R., Rymowicz, W., Lazar, Z., 2021. Sustainable surfactin production by *Bacillus subtilis* using crude glycerol from different wastes. *Molecules* 26, 3488.
- Janga, M.R., Raouf, M., Ulaganathan, K., 2017. Effective biocontrol of Fusarium wilt in castor (*Ricinus communis* L.) with *Bacillus* sp. in pot experiments. *Rhizosphere* 3, 50–52.
- Jasso-Salcedo, A.B., Hoppe, S., Pla, F., Escobar-Barrios, V.A., Camargo, M., Meimaroglou, D., 2017. Modeling and optimization of a photocatalytic process: degradation of endocrine disruptor compounds by Ag/ZnO. *Chem. Eng. Res. Des.* 128, 174–191.
- Jiang, B., Zhang, F., Sun, Y., Zhou, X., Dong, J., Zhang, L., 2014. Modeling and Optimization for Curing of Polymer Flooding Using an Artificial Neural Network and a

- Genetic Algorithm, vol. 45. Taiwan Institute of Chemical Engineers, pp. 2217–2224.
- Khan, R.A.A., Najeed, S., Mao, Z., Ling, J., Yang, Y., Li, Y., Xie, B., 2020. Bioactive secondary metabolites from *Trichoderma* spp. against phytopathogenic bacteria and root-knot nematode. *Microorganisms* 8, 401.
- Kloepper, J., Gutierrez-Estrada, A., McInroy, J., 2007. Photoperiod regulates elicitation of growth promotion but not induced resistance by plant growth-promoting rhizobacteria. *Can. J. Microbiol.* 53, 159–167.
- Labiadh, M., Dhaouadi, S., Chollet, M., Chataigne, G., Tricot, C., Jacques, P., Flahaut, S., Kallel, S., 2021. Antifungal lipopeptides from *Bacillus* strains isolated from rhizosphere of Citrus trees. *Rhizosphere* 19, 100399.
- Lanka, S., Latha, J.N.L., 2015. Response surface methodology as a statistical tool for fermentation media optimization in lipase production by palm oil mill effluent (POME) isolate *Emericella nidulans* NFCCI 3643. *Methodology* 4, 2535–2545.
- Maji, K., Pratihari, D., Nath, A., 2014. Laser forming of a dome shaped surface: experimental investigations, statistical analysis and neural network modeling. *Opt Laser Eng.* 53, 31–42.
- Rabahi, A., Hauchard, D., Arris, S., Berkani, M., Achouri, O., Meniai, A.H., Bencheikh-Lehocine, M., 2018. Leachate effluent COD removal using electrocoagulation: a response surface methodology (RSM) optimization and modeling. *Desalination Water Treat.* 114, 81–92.
- Rahman, M.S., Ano, T., Shoda, M., 2007. Biofilm fermentation of iturin A by a recombinant strain of *Bacillus subtilis* 168. *J. Biotechnol.* 127, 503–507.
- Raj, P., Biju, P., Deepanraj, B., Senthilkumar, N., 2023. Predicting the wear performance of graphene and silicon nitride reinforced aluminium hybrid nanocomposites using artificial intelligence approach. *Carbon Letters* 1–26.
- Rajasekaran, T., Palanikumar, K., Latha, B., 2022. Investigation and analysis of surface roughness in machining carbon fiber reinforced polymer composites using artificial intelligence techniques. *Carbon Letters* 32, 615–627.
- Rani, L., Thapa, K., Kanojia, N., Sharma, N., Singh, S., Grewal, A.S., Srivastav, A.L., Kaushal, J., 2021. An extensive review on the consequences of chemical pesticides on human health and environment. *J. Clean. Prod.* 283, 124657.
- Samuel Ratna Kumar, P., Vaira Vignesh, R., Mashinini, P., Ramanathan, S., 2023. Tribological behavior of friction stir process surface hybrid composite AA5083/MWCNT/Al₂SiO₅ using multi-quadratic RBF algorithm. *Carbon Letters* 1–15.
- Tagg, J., McGiven, A., 1971. Assay system for bacteriocins. *Appl. Microbiol.* 21, 943–943.
- Th  atre, A., Cano-Prieto, C., Bartolini, M., Laurin, Y., Deleu, M., Niehren, J., Fida, T., Gerbinet, S., Alanjary, M., Medema, M.H., 2021. The surfactin-like lipopeptides from *Bacillus* spp.: natural biodiversity and synthetic biology for a broader application range. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 9, 623701.
- Thomas, P., Rumjit, N.P., Lai, C.W., Johan, M.R.B., 2021. EDTA functionalised cocoa pod carbon encapsulated SPIONs via green synthesis route to ameliorate textile dyes-Kinetics, isotherms, central composite design and artificial neural network. *Sustainable Chemistry and Pharmacy* 19, 100349.
- Torres, M.J., Brandan, C.P., Sabat  , D.C., Petroselli, G., Erra-Balsells, R., Audisio, M.C., 2017. Biological activity of the lipopeptide-producing *Bacillus amyloliquefaciens* PGPBacCA1 on common bean *Phaseolus vulgaris* L. pathogens. *Biol. Control* 105, 93–99.
- Tsalgatidou, P.C., Thomloui, E.-E., Delis, C., Nifakos, K., Zambounis, A., Venieraki, A., Katinakis, P., 2023. Compatible consortium of endophytic *Bacillus halotolerans* strains cal. L. 30 and cal. F. 4 promotes plant growth and induces systemic resistance against *botrytis cinerea*. *Biology* 12, 779.
- Vasseghian, Y., Berkani, M., Almomani, F., Dragoi, E.-N., 2021. Data mining for pesticide decontamination using heterogeneous photocatalytic processes. *Chemosphere* 270, 129449.
- Vasseghian, Y., Dragoi, E.-N., 2018. Modeling and optimization of acid blue 193 removal by UV and peroxydisulfate process. *J. Environ. Eng.* 144, 06018003.
- Wang, J., An, Y., Li, Z., Lu, H., 2022. A novel combined forecasting model based on neural networks, deep learning approaches, and multi-objective optimization for short-term wind speed forecasting. *Energy* 251, 123960.
- Wang, X., Wen, Q., Wu, J., Yang, J., Zhao, X., Wang, Z., 2023. A novel neural network and sensitivity analysis method for predicting the thermal resistance of heat pipes with nanofluids. *Appl. Therm. Eng.* 236, 121677.
- Wu, X., Hu, J., Wang, X., Xin, L., Li, C., Wei, X., 2021. Effective removal of arsenide from aqueous solutions using mesoporous CoFe₂O₄/graphene oxide nanocomposites assisted by artificial intelligence. *Carbon Letters* 1–16.
- Yuan, J., Cao, J., Yu, F., Ma, J., 2022. Microbial degradation of polystyrene microplastics by a novel isolated bacterium in aquatic ecosystem. *Sustainable Chemistry and Pharmacy* 30, 100873.
- Zhang, Y., Shen, Y., Chen, C., Gan, Z., Chen, J., Wan, C.C., 2022. Loquat leaf extract and alginate based green composite edible coating for preserving the postharvest quality of Nanfeng tangerines. *Sustainable Chemistry and Pharmacy* 27, 100674.
- Zhi, Y., Wu, Q., Xu, Y., 2017. Genome and transcriptome analysis of surfactin biosynthesis in *Bacillus amyloliquefaciens* MT45. *Sci. Rep.* 7, 40976.

Titre : Valorisation de la biomasse lignocellulosique pour la recherche et la production de micro-organismes développant des potentialités de bio-contrôle et étude de leur application dans l'agriculture.

Auteur : MANSOUR Mehdi

Résumé :

Dans la présente étude 43 isolats bactériens et 29 isolats fongiques ont été isolés à partir des échantillons du sol et du bois provenant de la forêt d'El Baaraouia (Constantine- Algérie) ; en plus des coques des noix et des amandes. Parmi ces isolats, seules les bactéries M4 et la moisissure P2L ont démontré une activité enzymatique intéressante d'hydrolyse de cellulose, d'hémicellulose et de la lignine. Ces deux microorganismes ont développé des effets antifongiques divers *vis-à-vis* les deux champignons phytopathogènes identifiés ici par voie moléculaire comme *Fusarium napiforme* (ON204349) et *Alternaria alternata* (ON714501), avec un meilleur effet observé chez la bactérie M4 (taux d'inhibition de 72% et de 64%, respectivement) *versus* le champignon P2L (35,4% et de 52,3 de taux d'inhibition, respectivement). L'identification moléculaire de M4 (analyse d'*ADN 16S*) et P2L (analyse *ITS*) a prouvé qu'il s'agit de *Bacillus halotolerans* (ON204239) et de *Chaetomium strumarum*, respectivement. *B. halotolerans* (ON204239) a montré une tolérance importante aux conditions extrêmes. En effet, il s'est bien développé sur milieux à concentration de NaCl allant de 0 à 100 g/L, à pH compris entre 4 et 11, et dans des températures d'incubation variant de 25 à 55°C.

L'étude de l'activité antifongique des surnageants issus de la mise en culture de la souche M4 dans deux milieux différents, à savoir : MA, contenant la paille d'avoine comme seule source de carbone et LB, milieu Luria-Bertani, a révélé des zones d'inhibition de 12 mm et 15 mm de diamètre contre *F. napiforme* (ON204349) et *A. alternata* (ON714501), respectivement, pour le surnageant LB; et des zones d'inhibition plus importante dans le cas du surnageant MA (16 mm et 20 mm, respectivement), ce qui ouvre, désormais, la voie sur l'exploitation industrielle de ce déchet ligno-cellulosique. Le modèle de Box-Behnken (BBD) et de la méthode des surfaces de réponse (RSM) a permis de déterminer des valeurs optimales prédites du pH, du temps d'incubation, de la concentration du substrat et de la température, et ce dans le but d'optimiser l'activité antagoniste du surnageant de culture de *B. halotolerans* (MA) contre *F. napiforme* (ON204349). Les conditions optimales trouvées sont les suivantes : concentration en substrat de 7 g/L, temps d'incubation de 30 h, pH 3.4 et température de 37,4°C. L'application de ces conditions optimisées *in vitro* ont réellement permis d'obtenir une importante zone d'inhibition (18 mm) après 24 heures. L'optimisation de ce même effet antagoniste en utilisant le modèle des réseaux de neurones artificiels (ANNs) couplé à un algorithme génétique (GA) a permis de déterminer les conditions optimales suivantes : concentration en substrat de 7 g/L, temps d'incubation de 30 h, pH de 2,31 et température de 37,4°C ; avec obtention d'une importante zone d'inhibition (18,5 mm) après avoir été appliquées en conditions réelles.

Les tests de pathogénicité ont confirmé que *F. napiforme* et *A. alternata* sont bien à l'origine des symptômes de maladie qui sont apparus sur les plantes de tomate avec des taux de sévérité de l'ordre de 88,9% et 25%, respectivement. Les tests réalisés *in vivo* dans des conditions de pots et en plein champs en utilisant le surnageant MA, ont montré un effet significatif plus important que celui du surnageant LB, et ce sur la diminution de la sévérité de la maladie provoquée par *F. napiforme*, et l'augmentation de la taille moyenne des plants, du nombre moyen de feuilles et de fleurs par plante, ainsi que la masse moyenne racinaire. L'observation microscopique de l'effet antagoniste du *B. halotolerans* (ON204239) contre *F. napiforme* (ON204349) par le microscope à fluorescence a révélé une diminution significative du nombre de cellules vivantes de *F. napiforme* (ON204349), confirmant ainsi l'effet inhibiteur de *B. halotolerans* (ON204239) sur cet agent phytopathogène responsable de la fusariose. L'analyse UPLC des surnageants de *B. halotolerans* a permis de montrer que ce dernier a produit des surfactines et des iturines lorsqu'il était cultivé sur milieu MA alors que sur milieu LB, il n'a produit que des surfactines. L'analyse UPLC-MS des surfactines produits par *B. halotolerans* (ON204239) inoculé sur le milieu LB a permis d'identifier cinq analogues: C12, C13, C14, C15 et C16. Par contre, deux autres analogues de surfactines en plus de ces derniers sont apparus dans les spectres de masse du surnageant MA (surfactines C17 et C18). L'évaluation de l'effet PGPR *in vitro* a révélé que *B. halotolerans* (ON204239) possède des activités significatives telles que la production d'amylase (IE =2,51), de caséinase (IE =1,40), d'azote, d'acide cyanogène (HCN), d'ammoniaque, d'acide indole acétique, de sidérophores et de biosurfactants. Ce qui signifie que cette souche pourrait jouer un rôle bénéfique dans la stimulation et la croissance des plantes.

Mots-clés : Biomasse ligno-cellulosique, *Bacillus halotolerans*, *Fusarium napiforme*, fusariose, réseaux de neurones artificiels (ANNs), algorithme génétique (GA), surfactines, biocontrôle.

Jury :Président, **KACEM CHAUCHE Noredine**, Professeur Université Frères Mentouri Constantine 1 – Directrice de thèse, **KARA ALI Mounira**, Professeur Université, M'hamed Bougara Boumerdès – Examineurs : **DEHIMAT Laid**, Professeur, Université Frères Mentouri Constantine 1 - **BENSERRADJ Ouafa**, MCA, Université Frères Mentouri Constantine 1 – **BERKANI Mohammed**, MCA Ecole Nationale Supérieur de Biotechnologie Taoufik Khaznadar Constantine - **BOUDJEMA Khaled**, Professeur, Université M'hamed Bougara Boumerdès.