

CARACTÉRISATION DES *BACILLUS* SPP. ISOLÉES DU SOL D'OLIVIER ET ÉTUDE DE LEURS POTENTIALITÉS DE BIOCONTROLE CONTRE LA MOUCHE DE L'OLIVE *DACUS OLEAE* (GMEL) AU NORD DE L'ALGÉRIE

MEDDAS Seyyid Ali^{1*}, OULEBSIR-MOHANDKACI Hakima², HADJOUTI Rima², REGHMIT Nacer², HOUAS Yasmine², AMIRAT Dihia², NAITBOUDA Lamine³ et DOUMANDJI-MITICHE Bahia¹

1. Département de Zoologie Agricole et Forestière– Ecole Nationale Supérieure Agronomique ENSA, El Harrach, Alger, Algérie–
2. Laboratoire de valorisation et conservation des ressources biologiques, Faculté des Sciences, Université M'hamed Bougara – Boumerdes-BP35000, Algérie.
3. Service de caractérisation, Centre de Développement des Technologies Avancées (CDTA), Baba Hassen, Alger, Algérie

Reçu le 24/12/2019, Révisé le 22/06/2020, Accepté le 28/06/2020

Résumé

Description du sujet : L'olivier *Olea europaea* L. est considéré comme arbre très important pour les pays méditerranéens, à cause de la valeur de ses fruits frais ou transformés en huile. Cependant, la production des olives reste confrontée aux plusieurs obstacles citant ceux d'ordre phytosanitaire, comme la mouche de l'olive *Dacus oleae* (Diptera : Tephritidae), qui cause des dégâts considérables surtout sur le fruit.

Objectifs : L'application des méthodes de lutte biologique par l'exploration de la microflore du sol s'avère intéressante. C'est dans ce contexte que nous nous sommes intéressés à l'isolement de souches bactériennes appartenant au genre *Bacillus* à partir de la rhizosphère de deux vergers oléicoles situés dans la région de Boumerdes et Béjaïa, ensuite des tests d'efficacité à l'égard de *Dacus oleae* ont été réalisés.

Méthodes : Après échantillonnage du sol, nous avons procédé à l'isolement, la purification et la caractérisation des isolats bactériens. Des essais de sélection des souches bactériennes ayant une activité insecticide la plus performant ont été effectués, suivis des tests de pathogénicité sur des larves au cinquième stade (L5) de la mouche de l'olive.

Résultats : 22 souches de *Bacillus* ont été isolées dans les deux régions, les tests d'efficacité montrent que le taux de mortalité est très important dès les premières heures de traitement (de 4 à 20 heures), et cela pour plusieurs souches de *Bacillus* notamment BM12. En effet, le taux de mortalité corrigée obtenus après traitement des larves L5 de *D. oleae* par la forte dose D1 de cette souche, atteints 100% au bout de 16h uniquement. L'examen des TL50 montre que les larves L5 de *Dacus Oleae* traitées par la même souche de *Bacillus* présentent des TL50 qui varient de 5 à 10 heures en fonction de la dose.

Conclusion : Avec le taux de mortalité élevé et la diversité des souches obtenues, il s'avère très intéressant de pousser la caractérisation et l'identification des souches isolées et leurs métabolites bioactifs spécifiquement les toxines pour une meilleure exploitation dans les programmes de lutte contre la mouche des olives.

Mots clés: Isolement ; Caractérisation ; Olivier ; *Dacus oleae* ; *Bacillus* ; biocontrol.

CHARACTERIZATION OF *BACILLUS* SPP. ISOLATED FROM THE OLIVE SOIL AND STUDY OF THEIR POTENTIALITIES OF BIOCONTROL AGAINST THE OLIVES FLY *DACUS OLEA* (GMEL) IN NORTH OF ALGERIA

Abstract

Description of the subject: The olive tree is considered to be a very important tree for the Mediterranean countries, due of the value of its fruit, either fresh or processed into oil. However, the production of olives still faces several obstacles, mainly of a phytosanitary nature, such as the olive fly *Dacus oleae* (Diptera : Tephritidae), which causes considerable damage, especially to the fruit.

Objectives. The application of biological control methods by exploring the soil microflora is of interest. It is in this context that we were interested in isolating bacterial strains belonging to the genus *Bacillus* from the rhizosphere of two olive orchards located in the Boumerdes and Béjaïa region, then efficacy tests against *Dacus oleae* were carried out.

Methods: After sampling the soil, we proceeded to isolate, purify and characterize the bacterial isolates. Tests for selection of the bacterial strains having the most effective insecticidal activity against *Dacus oleae* were carried out, followed by pathogenicity tests on larvae at the fifth stage (L5) of the olive fly.

Results: 22 *Bacillus* strains were isolated in the two regions, the efficacy tests show that the mortality rate is very high from the first hours after treatment (from 4 to 20 hours), and this for several *Bacillus* strains including BM12. Indeed, the corrected mortality rate obtained after treatment of the L5 larvae of *Dacus oleae* by the high dose D1 of this strain, reached 100% after 16 hours only. Examination of the LT50s shows that the L5 larvae of *Dacus oleae* treated with the same strain of *Bacillus* have LT50s which vary from 5 to 10 hours depending on the dose.

Conclusion: With the high mortality rate and the diversity of strains obtained, it is very interesting to continue the characterization of the other strains and their bioactive metabolites specifically toxins for the control of olive fly larvae.

Keywords: Isolation ; Characterisation ; Olive ; *Dacus oleae* ; *Bacillus* ; biocontrol.

* Auteur correspondant: MEDDAS Seyyid Ali, E mail : sidali.1988.agro@gmail.com

INTRODUCTION

La mouche de l'olive *Dacus oleae* (Gmel) (Diptera–Tephritidae), est une mouche monophage, carpophages attaquant les fruits de différentes sous-espèces de *Olea europaea* L. (cultivée et sauvage). Cette mouche est le principal parasite de l'olive dans le monde entier et sa nocivité a été documentée depuis longtemps dans les zones méditerranéennes [1]. Les dégâts économiques de *Dacus oleae* sur les fruits de table résultent à la fois de la ponte des mouches à la surface des fruits et de l'activité alimentaire des larves, qui provoque une grande dépréciation des olives [2]. En effet, des études menées dans plusieurs pays producteurs d'olives montrent que la vulnérabilité de la qualité de l'huile d'olive extraite de différentes variétés varie selon le niveau d'infestation [3, 4]. Les moyens de bio-contrôle bénéficient d'une image favorable auprès de l'opinion publique et des consommateurs pour les fruits. Ils constituent aussi des solutions techniques efficaces, naturellement adoptées par les producteurs dès lors que tous les verrous pour leur mise en œuvre sont supprimés [5]. Le contrôle des bioagresseurs de manière biologique est le plus avantageux pour l'environnement en comparaison avec le contrôle chimique [6]. Par ailleurs, le sol est le siège de compétition microbienne à raison de sa richesse biologique très variée, la flore microbienne y est très variée ; elle comprend des champignons, protozoaires, et virus exerçant divers effets influençant le développement des plantes. Ils peuvent également améliorer leur compétitivité et leurs réponses aux facteurs de stress externes [7, 8]. Certains sols ont la capacité de réprimer l'expression de maladies en impliquant fréquemment des bactéries non pathogènes [9, 8]. L'utilisation de *Bacillus thuringiensis* comme agent de lutte biologique est la méthode la plus réputée car elle s'est avérée extrêmement précieuse [10]. Les bactéries entomopathogènes du genre *Bacillus* tel que *B. thuringiensis* (Bt) produisent des protéines insecticides sous forme d'inclusions cristallines pendant leurs phase de sporulation, connues sous le nom de toxines Cry ou Cyt, qui se sont révélées efficaces contre d'importants ravageurs lépidoptères [11], orthoptères [12] et également contre certaines espèces de moustiques [13].

La présente étude a permis d'isoler des souches bactériennes du genre *Bacillus*, à partir de la rhizosphère d'olivier en vue de tester leur effet insecticide sur les larves de la mouche de l'olive *Dacus oleae*.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. Matériel biologique

Les souches bactériennes utilisées au cours de cette étude sont des bactéries telluriques isolées du sol rhizosphérique d'olivier au niveau de deux régions côtières de l'Algérie ; Boumerdes (Boudouaou à 195 m) et Bejaia (Sidi Aich à 111 m). L'insecte choisit est la mouche de l'olive *Dacus oleae*, capturé dans la station de Sidi Aich à Béjaia et élevé en masse au laboratoire.

2. Méthodes

2.1 Isolement et caractérisation des souches bactériennes

-Sites de prélèvement et collecte d'échantillons de sol

Les échantillons de sol ont été prélevés de deux oliveries au niveau de deux régions côtières de l'Algérie ; l'une est localisées dans la région de Boudouaou (wilaya Boumeredes) (Latitude : 36.7003998- Longitude : 3.4296446), la deuxième est située dans de la région de Sidi Aich (wilaya de Bejaia) (Latitude : 36,3844-Longitude : 4,3992). L'échantillonnage a eu lieu le 28 Décembre 2018. Les échantillons sont prélevés au niveau de la couche rhizosphérique sur un rayon de 1 m autour des racines, à une profondeur de 30 à 50 cm, ils sont ensuite mis dans des sachets portant des indications de lieu et de date de prélèvement et transportés au laboratoire [14].

-Purification et conservation des isolats

Les différents échantillons du sol sont séparément séchés, tamisés et broyés finement. Le sol a été chauffée par la suite à 80°C pendant 20 mn afin d'éliminer toutes les bactéries non sporulantes [14, 15]. La préparation de la solution mère a été suivie par une série de dilutions de 10^{-1} à 10^{-6} . Ces dernières ont été utilisées dans les différentes étapes de la purification sur gélose nutritive. En effet, les colonies qui nous semblent répondre aux critères de genre recherché (*Bacillus*) ont été repiquées successivement jusqu'à l'obtention d'une culture pure.

Les isolats purifiés ont été conservés par congélation -30°C, mélange eau/glycérol à 30% de glycérol v/v [16].

-Caractérisation phénotypique des isolats

La caractérisation phénotypique est basée sur des critères macroscopiques sur milieu solide [17], et sur des caractères microscopiques tel que la mobilité, coloration de Gram et la coloration de la spore [18, 19]. La caractérisation biochimiques et physiologique est basée sur/ la mise en évidence des enzymes respiratoires ; la catalase, les nitrates réductases, le type respiratoire (gélose viande foie) et la dégradation de certains substrats tel que le mannitol, ainsi que l'étude de la résistance à 45°C, 55°C et 65°C [18, 20].

-Microscopie à balayage

Le principe de base de la microscopie électronique à balayage est qu'un faisceau très fin d'électrons, monocinétique, balaie la surface d'un échantillon où se produisent des interactions détectées par un capteur qui contrôle la brillance d'un oscilloscope cathodique dont le balayage est synchronisé avec celui du faisceau d'électrons. Le nombre de particules réémises varie en fonction de la topographie, de la composition et de la texture de la surface observée [21]. Les bactéries congelées (cryofixées) peuvent être examinées rapidement à des températures très basses (inférieures à -120°C) par cryo-SEM. Pour permettre la vision avec le MEB, les échantillons doivent être inducteurs ; ces échantillons sont donc métallisés sur une très fine couche (quelques nanomètres) par une technique de dépôt par pulvérisation cathodique ou un alliage d'or recouvre la surface de l'échantillon [22].

-Mise en évidence de l'activité hydrolytique extracellulaire

Détermination de l'activité protéolytique : la recherche de la caséinase a été déterminée selon la méthode de Smibert et Krieg [23] par la mise en culture pendant deux jours d'incubation à 28°C des isolats sur gélose au lait écrémé. Le développement d'un halo autour des colonies indique une réaction positive. Détermination de l'activité amylolytique : Ce test a été réalisé en cultivant la souche sur une gélose nutritive contenant 1% d'amidon. Après incubation, la culture bactérienne a été recouverte d'une solution de Lugol. L'hydrolyse de l'amidon est ainsi mise en évidence par l'apparition d'une zone claire autour de la colonie, par contre un résultat négatif se traduit par une couleur brune autour de la culture [24].

Détermination de l'activité lipolytique : le test de lécithinase a été réalisé par l'ensemencement de la souche en strie sur gélose nutritive contenant l'émulsion du jaune d'œuf stérile. Après 24 à 72 heures d'incubation à 30°C, l'apparition d'une zone claire autour de la culture prouve que la souche possède la lécithinase [24].

Pouvoir pectolytique : la mise en évidence des pectinases a eu lieu en utilisant des tubercules de pomme de terre, désinfectées et trachées en morceaux et déposés dans des boîtes de Pétri contenant de l'eau physiologique stérile, quelques gouttes d'une suspension bactérienne en phase de croissance sont déposées sur les tranches. Après 7 à 14 jours, la réaction est considérée positive par l'apparition de pourriture qui s'accompagne d'une forte odeur [25]. La mise en évidence du pouvoir chitinolytique : Ce test a été réalisé par ensemencement des bactéries sur milieu de culture gélosé à base de chitine colloïdale comme substrat enzymatique et comme seule source de carbone pour la croissance bactérienne [26].

2.2. Application des traitements biologiques

-Élevage de la mouche

La mouche de l'olive est un insecte carpophage, les individus testés sont issus d'un élevage en masse mené au laboratoire. En effet, les larves âgées ont été capturées à partir d'une oliveraie de la région de Béjaïa pendant la période de la cueillette des olives (entre novembre et décembre), ces dernières ont été déposées dans un milieu d'élevage synthétique [27] (légèrement modifié) (550 ml d'eau, 20 ml d'huile d'olive, 22,5 ml de tween 80, 20 g de sucre, 75 g de levure, 30 ml d'HCl et 275 g de cellulose avec la présence de fruits d'olives infectés). Cet élevage a duré trois mois environ, période pendant laquelle, des adultes ont émergées et se sont reproduits, les larves ainsi obtenues ont été utilisées dans la présente étude.

-Préparation du bouillon de sporulation

Des colonies fraîchement préparées des différentes souches de *Bacillus* isolées et caractérisées ont été inoculées dans des tubes à essai contenant 5 ml de bouillon sporulant (Sels basaux minimaux, MBS - 0,68% KH₂PO₄, 0,03% MgSO₄•7H₂O, 0,002% MnSO₄, 0,002% Fe₂(SO₄)₃, 0,002% ZnSO₄•7H₂O, 0,002% CaCl₂, 1% tryptone et 0,2% d'extrait de levure, pH 7,2) [28].

Les tubes ont ensuite été incubés à 30°C sous agitation (200 tr / min) pendant 48 h pour permettre la sporulation et la formation de cristaux [15].

-Test de sélection

Ce test préliminaire est réalisé sur toutes les souches de *Bacillus* isolées, permettant de sélectionner impérativement les souches ayant une activité insecticide la plus performante [15]. Dans les essais biologiques de toxicité initiaux, les larves L5 de *D. oleae* sont traitées par la suspension bactérienne préalablement préparée, en la versant dans des petites boîtes de Pétri, contenant chacune dix larves avec le milieu d'élevage de *Dacus oleae* à raison de 1%. Chez les témoins, la suspension bactérienne est remplacée par de l'eau physiologique stérile. Les tests ont été effectués en triplicata. La mortalité a été enregistrée après 24 et 48 heures respectivement.

-Test de pathogénicité

Après le screening des 22 isolats hautement toxiques de *Bacillus*, les larves ont été réparties sur des boîtes de Pétri, chaque boîte occupe 10 larves de *Dacus oleae*. Ces dernières ont été immergées dans le milieu d'élevage additionné de la solution sporale ajustée à la concentration voulue. Les concentrations correspondent aux dilutions de 10^{-1} à 10^{-4} , elles sont en nombre de 4 (D1 : $2,7 \times 10^9$, D2 : $2,4 \times 10^8$, D3 : 2×10^8 et D4 : 4×10^7 spores/ml). Les boîtes contenant les cinq larves sont répétées trois fois, où on aura 24 unités expérimentales pour les deux souches. Les boîtes de cultures et le témoin sont placées dans un environnement contrôlé (obscurité, T° optimal), c'est ainsi que les mortalités seront observées chez les larves traitées et les larves non traitées tout au long de l'expérimentation (chaque 4h). Les tests ont été effectués en triplicata.

3. Analyse statistique

Pour confirmer l'efficacité des traitements biologiques effectués, les résultats obtenus ont été soumis aux tests de l'analyse de la variance. Les valeurs de $p \leq 0,05$ sont considérées statistiquement significatives. Nous avons appliqué en outre le test de Tuckey ou test de la différence franchement significative avec la boîte à moustache qui permet de vérifier la significativité de la variable d'intérêt entre toutes les combinaisons des modalités. Le Logiciel utilisé est le SPSS (Statistical Package for the Social Science version 11.0.1).

RÉSULTATS

1. Caractères phénotypiques et activité enzymatique des souches isolées

Les isolements effectués à partir du sol rhizosphérique de l'olivier des deux régions ; Boumerdes et Béjaïa ont permis d'obtenir 22 souches appartenant au genre *Bacillus*. Le nombre de souches isolées diffère légèrement selon la station dont on a répertorié 13 souches dans la station de Boumerdes contre, 9 souches ont été isolées dans la station de Béjaïa. Les souches appartenant au genre *Bacillus*, possèdent toutes les caractères culturels décrits par Euzéby [29]. Les bactéries se développent bien à la surface de la gélose. L'aspect des colonies obtenues est extrêmement variable. En général, les colonies sont larges, lisses, plates, fréquemment circulaires, avec des bords irréguliers, de couleur crème ou blanc ou encore jaunâtre (Fig. 1). L'observation microscopique révèle des bacilles longs droits, les cellules sont des Gram positifs présentant une forme sporale (Fig. 2). Les résultats du MEB montrent des cellules sous forme de batonnet long à extrémité carrées, légèrement arrondies (Fig. 3).

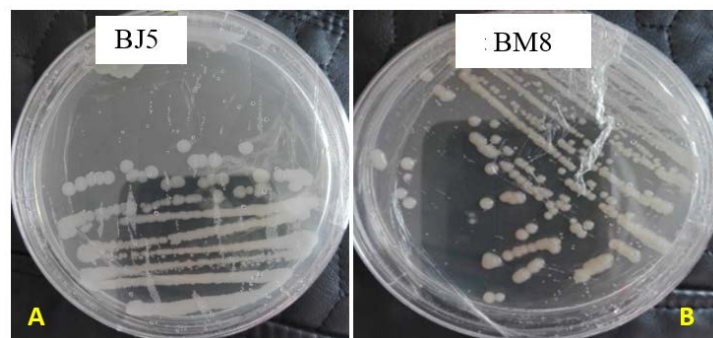


Figure 1: Aspect des colonies de deux isolats appartenant au genre *Bacillus* sp. (BJ5 et BM8) après 24h d'incubation à 30°C sur GN. Le code BJ correspond aux isolats de la région de Béjaïa et le code BM correspond aux isolats de la région de Boumerdes.

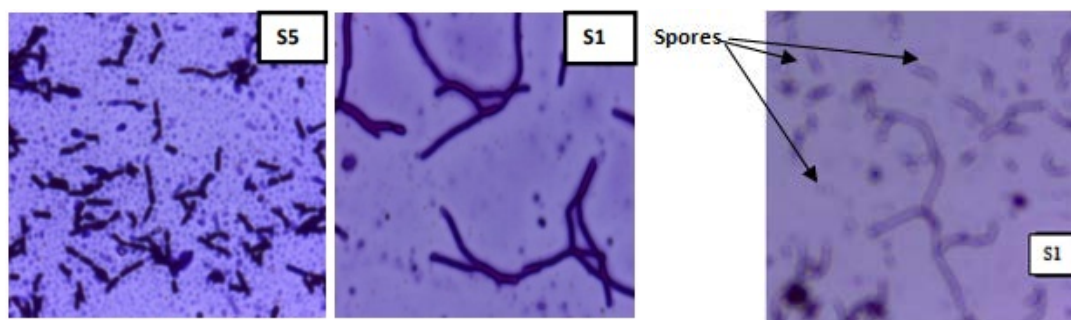


Figure 2: Aspect des cellules bactériennes et la forme sporales après coloration de Gram observé sous microscope optique (G×1000)

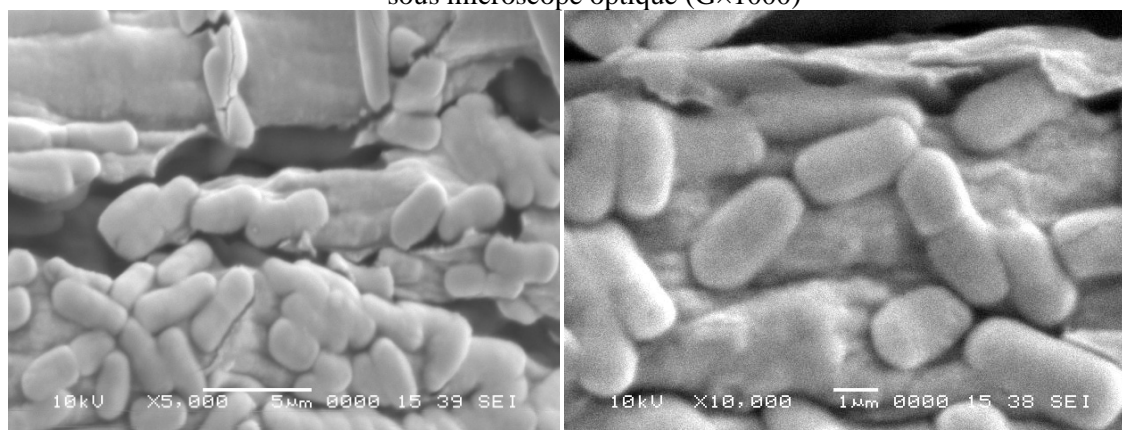


Figure 3 : Aspect des cellules bactériennes (souche BM12) observées sous microscope électronique à balayage MEB (G×5000 et G×10000)

Les résultats de l'étude physiologique et biochimique concernent la production de la catalase, la réduction des nitrates en nitrites, le type respiratoire sur la gélose viande foie ainsi que la résistance à différentes températures sont résumés dans le tableau 1.

Les résultats étaient très variables d'une région à l'autre et même au sein de la même région.

Ce qui confirme la biodiversité de notre sol. De même pour les différentes enzymes recherchées, des réponses variables ont été enregistrées (Tableau 1). Par ailleurs, l'étude de l'activité enzymatique nous a permis de constater une particularité de production d'une gamme très diversifiée en enzymes chez les souches isolées (Fig. 4).

Tableau 1: caractères phénotypiques et activité enzymatique des souches isolées

Souches	Gram	Forme de la cellule	Catalase	Nitrate	Viande Foie	Caséine	Lécithine	Amidon	chitinase	Pectine	T 45°	T 65°
BJ (1)1	+	Bacille	-	+	Aéro/anaéro facultatif	+	-	ND	+	+	-	-
BJ(7)	+	Bacille	-	+	Aéro/anaéro facultatif	+	-	+	+	+	+	-
BJ (6)	-	Coccobacille	+	+	Aéro stricte	+	ND	-	-	+	-	-
BJ(4)	+	Bacille	+	+	Aéro/anaéro facultatif	ND	-	+	-	+	-	-
BJ (5)1	+	Bacille	+	++	Aéro/anaéro facultatif	+	+	+	+	-	+	-
BJ (2)	+	Bacille	-	+	Aéro/anaéro facultatif	ND	ND	ND	+	+	-	-
BJ (3)	+	-	-	+	Aéro/anaéro facultatif	+	+	+	+	-	-	-
BJ (1)2	+	-	-	+	Aéro/anaéro facultatif	-	-	ND	-	+	-	-
BJ (5)2	+	-	-	+	Aéro/anaéro facultatif	ND	+	+	+	-	-	-
BM (10)	+	-	+	+	Aéro/anaéro	ND	ND	ND	+	+	-	-
BM (12)	-	Coccobacille	+	+	Aéro/anaéro	-	-	+	+	+	+	-
BM (11)	-	-	-	+	Aéro stricte	ND	ND	ND	-	+	-	-
BM (13)	-	-	-	+	Aéro stricte	-	-	ND	+	+	-	-
BM (8)	+	-	-	+	Aéro stricte	+	ND	ND	-	+	-	-
BM (4)1	+	Bacille long	+	+	Aéro stricte	+	ND	+	-	+	-	-
BM (3)	+	-	-	+	Aéro/anaéro	+	+	+	+	+	-	-

BM (5)	-	-	-	+	Aéro stricte	-	-	+	-	+	-
BM (1)	+	-	+	+	Aéro	+	+	+	-	-	-
BM (7)	+	Bacille long	+	+	Aéro/anaéro facultatif	ND	ND	-	+	+	-
BM (4) ₂	+	-	-	+	Aéro stricte	ND	ND	-	+	+	-
BM (4) ₃	+	-	-	-	Aéro/anaéro stricte	ND	ND	-	+	+	-
BM (2)	-	-	-	-	Aéro/anaéro	-	ND	+	+	+	-

(BJ : *Bacillus* de la station Béjaia, BM : *Bacillus* de la station de Boumerdes ND : non déterminé), - : résultats négatifs ; + : résultats positifs ; ++ : dénitrification

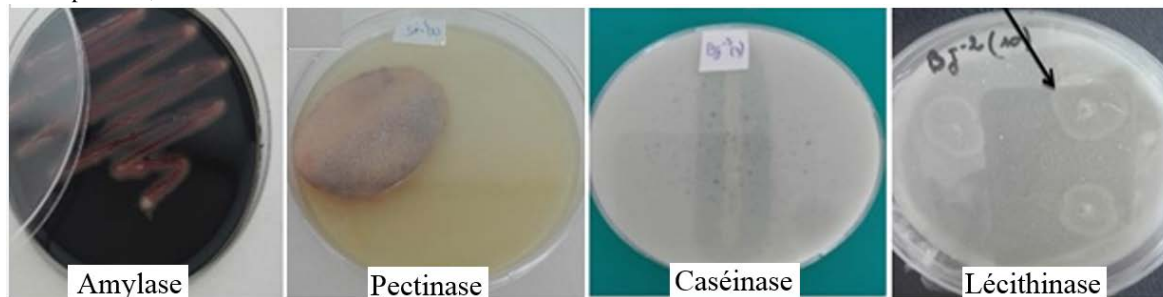


Figure 4 : Résultats des tests de mise en évidence de quelques enzymes hydrolytiques chez les différentes souches de *Bacillus* sp. isolées

2. Résultats de la sélection des souches entomopathogènes

Le test de sélection a démontré que toutes les souches de *Bacillus* isolées sont capables de présenter des effets mortels sur les larves de *D. oleae* dans un délai très court (14 à 20 heures). Toutes les souches ont été donc classées comme étant des entomopathogènes présumés. Le principal signe qui apparaît chez les cadavres ayant été traités par les bactéries isolées, c'est le noircissement du corps juste après la mort suite à la production de la mélanine chez ces derniers (Fig. 5). Concernant les résultats des taux de mortalité obtenus après traitements des larves L5 de *D. oleae* par les 22 souches de *Bacillus* sp isolées des deux stations de Béjaia et Boumerdes, les mortalités commencent à partir de la 7^{ème} heure avec la souche BJ (5) avec un taux de 60% suivi de la souche BJ (3) avec le même taux enregistré après 21 heures. Au bout de 48 heures, les taux de mortalité ont atteint les 100% et cela avec presque la totalité des souches testées (Fig. 6). D'autre part, Pour les isolats de la région de Boumerdes, On constate également qu'il y a une divergence de taux de mortalité entre les différentes souches testées sur les larves, avec un pourcentage de 20% dès les premières 7 heures avec les souches BM (2) et BM (4)₁. Dès la 35^{ème} heure, les taux de mortalité s'élèvent avec le nombre de souches affectant les larves de la mouche, avec un taux de 100% de mortalité pour la souche BM (3) (Fig. 6).

3. Evaluation de la pathogénicité des souches sélectionnées

Les souches utilisées dans l'étude de la toxicité ont été sélectionnées du lot des souches isolées de la région de Boumerdes.

La souche BM (12) a démontré un taux de mortalité de 40% dans uniquement 7h. La souche BM (3) a causé une mortalité totale dans uniquement 35h. Les taux de mortalité corrigée obtenus après traitement des larves L5 de *D. olea* par quatre doses de la souche BM (12), montrent une mortalité distincte chez les individus dès la quatrième heure ($p < 0,0000$), où la forte concentration, D1 a résulté 40% de mortalité, suivie des doses D2 et D3, puis la faible dose D4 qui a causé juste 10 % de mortalité pendant la même période. Cette mortalité évolue dans le temps pour atteindre 100% à la 16^{ème} heure pour D1 et 20^{ème} heure pour les autres doses appliquées (Fig. 7a). Concernant la deuxième souche BM (3), on constate que les doses D1 et D2 et D3 affichent le même taux de mortalité au bout de 8h (38%), un taux élevé en le comparant à la D4 ayant donné 18% de mortalité. Cette mortalité évoluera à partir de la 12^{ème} heure et augmente progressivement. A la 16^{ème} heure, on remarque que le taux de mortalité de la D1 (80 %) dépasse légèrement la D3 et D4 (75%) et D2 avec (58%). 100% de mortalité a été obtenue après 20h pour la totalité des souches (Fig. 7b).

Par ailleurs, la boîte à moustache indique une similarité dans les résultats obtenus avec les différentes doses de la BM (3), par contre la souche BM (12) testées a donné des résultats similaires uniquement pour D1-D2 (Fig. 8). Parallèlement aux résultats obtenus pour le taux de mortalité, l'examen des TL50 montre des valeurs faibles ; 5,72 heures pour BM (12) et 7,27 heures pour BM (3) ; pour les fortes doses et des valeurs plus élevées ; 10,23 heures pour BM (12) et 9,01heures pour BM (3) pour les faibles doses.

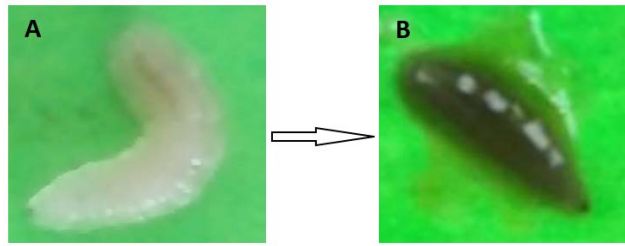


Figure 5 : Symptômes du traitement biologique chez les larves de *D. oleae* ayant subi un traitement par les différents isolats de *Bacillus* (à droite : larve de *D. oleae* après traitement ; à gauche : larve de *D. oleae* après traitement)

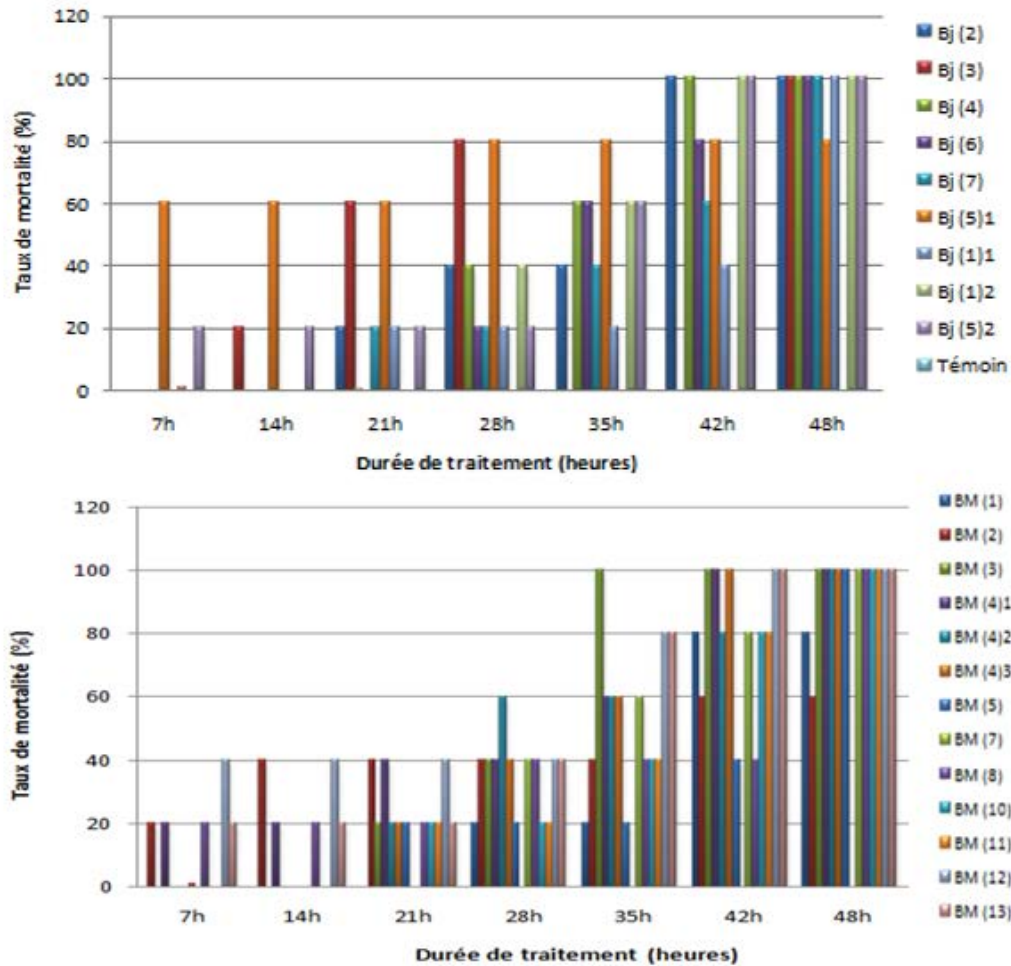


Figure 6: Cinétique de mortalité des larves de *D.oleae* traitées par les différents isolats de *Bacillus*. (BJ : *Bacillus* de la station de Béjaia, BM : *Bacillus* de la station de Boumerdes)

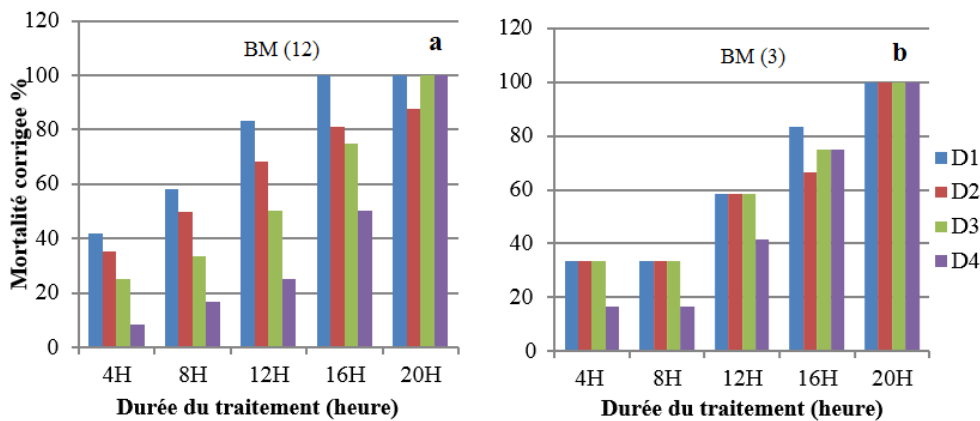


Figure 8 : Taux de mortalité corrigée chez les larves de *Dacus oleae* traitées par les deux souches BM (12) et BM (3) (D1 : $2.7 \cdot 10^9$, D2 : $2.4 \cdot 10^8$, D3 : $2 \cdot 10^8$ et D4 : $4 \cdot 10^7$ bactéries/ml)

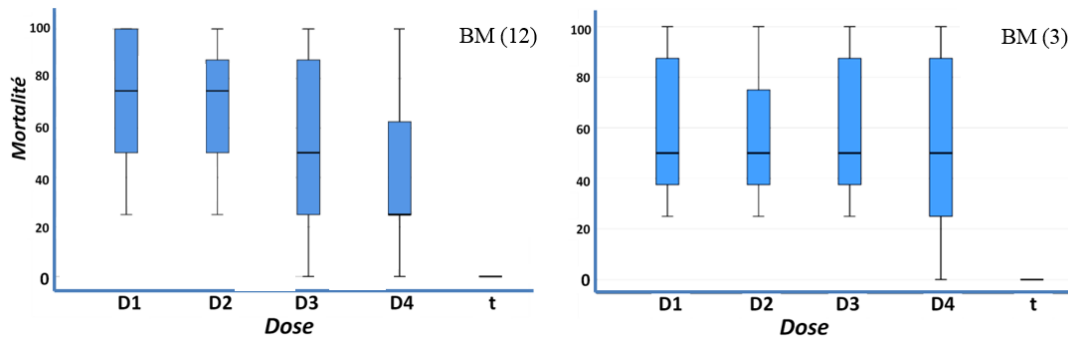


Figure 8: Effets des souches de *Bacillus* sp. BM3 et BM12 sur la mouche de l'olive

DISCUSSION

L'exploration de la diversité bactérienne, notamment du sol, dans le contrôle biologique des insectes ravageurs reste une alternative attrayante. En effet, les bactéries du genre *Bacillus* sont fréquemment isolées de différentes niches écologiques. Certaines peuvent agir comme des pathogènes des animaux, des plantes ou des champignons, alors que d'autres sont des bactéries bénéfiques vivant librement dans le sol [30]. C'est dans cette perspective de lutte que 22 souches de *Bacillus* ont été isolées dans des oliveraies de deux régions Béjaia et Boumerdes. La gélose nutritive ordinaire nous a permis d'isoler un nombre de souches de *Bacillus* qui diffère légèrement selon la station dont on a répertorié 13 souches dans la station de Boumerdes. En parallèle, 9 souches ont été isolées dans la station de Béjaia. L'étude des caractères morphologiques au microscope optique et au microscope électronique à balayage ainsi que les caractéristiques biochimiques indiquent une diversité très marquante. Les tests d'efficacité montrent que le taux de mortalité est très important dès les premières heures (de 4 à 20 heures), et cela pour plusieurs souches de *Bacillus* notamment BM (12) et BM (3). En effet, le taux de mortalité corrigée obtenus après traitement des larves L5 de *D. oleae* par la forte dose D1 de cette souche, atteints 100% au bout de 16h uniquement. L'examen des TL50 montre que les larves L5 de *Dacus oleae* traitées par ces deux dernières souches de *Bacillus* présentent des TL50 qui varient entre 5 et 10 heures en fonction de la concentration. Parmi les signes qui apparaissent chez les mourants, la mélanisation progressive du corps. Des symptômes comparables ont été observés par Oulebsir-Mohandkaci et Douamndji [8], ayant testé l'effet de quelques bactéries entomopathogènes sur le criquet migrateur *Locusta migratoria*.

D'après les auteurs, juste après la mort, les larves touchées commencent à se putréfier et prennent une coloration jaunâtre qui devient après noirâtre, les cadavres deviennent aussi mous avec des déformations chez les survivants. Parmi les bacilles les plus utilisés dans ce cadre, *B. thuringiensis* une bactérie qui fait partie du groupe *cereus* au sens large, est la bactérie entomopathogène la plus fréquemment utilisée dans la lutte biologique [31]. *B. thuringiensis* et *B. sphaericus* produisent des toxines protéiques regroupées dans des cristaux, tuant spécifiquement les larves d'insectes. L'une des étapes nécessaires pour aboutir à la mort des larves est la fixation des toxines sur un récepteur à la surface des cellules intestinales de l'insecte [32]. *B. thuringiensis* (*Bt*) est le micro-organisme star parmi les agents de biocontrôle, il existe plus de 70 souches différentes de *Bt*, cependant, seules trois souches sont majoritairement employées aujourd'hui, dont *Bt kurstaki*, la plus répandue qui est spécifique aux larves des lépidoptères. En raison de son champ d'action très restreint en milieu naturel, la toxicité de *Bt* n'affecte pas d'autres espèces que celles ciblées [33]. Un criblage approfondi des souches *Bt* et le séquençage du gène *cry* ont conduit à l'identification de plus de 700 séquences du gène *cry* [34]. Dans le cadre d'un programme local de lutte contre les moustiques au Kenya, une étude a été réalisée pour identifier des espèces de *Bacillus* spécifiques de moustiques, sur 453 isolats, 7 d'entre eux ont révélé une toxicité très puissante (>50% de mortalité) contre *Culex quinquefasciatus*. L'analyse phylogénétique a montré une homologie élevée avec *Lysinibacillus sphaericus* (six isolats) et *Bacillus thuringiensis* (un isolat) [15]. La souche *Bacillus* sp. (HF911367) isolée du sud de l'Algérie a causé 65% de mortalité chez les L5 de *Locusta migratoria* au bout d'une semaine après le traitement [35].

La dose des bactéries appliquées est un paramètre important à déterminer car elle fait varier le critère TL50. En effet, les résultats obtenus par Pagès et Ginibre [36] lors de différentes expériences d'injections des larves de *Spodoptera littoralis* par des cultures bactériennes de *Xenorhabdus* et *Photorhabdus* en phase stationnaire de croissance nous montrent des différences de TL50 par rapport à ceux obtenus à partir d'une culture en phase exponentielle. D'autre part, Les résultats obtenus nous ont permis de constater une particularité de production d'une gamme très diversifiée en enzymes chez les souches isolées, ce qui nous a permis de les classer comme étant des organismes d'intérêt notamment dans le cadre du biocontrôle. En effet, lors d'une étude antérieure, il ressort des résultats obtenus que 100% des souches bactériennes isolées de la rhizosphère d'un sol cultivé de la même région, produisent de l'amylase, 75% de la chitinase, 50% de la cellulase et enfin 17% de la phosphatase [11]. Les amylases sont des enzymes qui hydrolysent l'amidon ou le glycogène. Elles peuvent dériver de plusieurs sources comme les plantes, les animaux et les microorganismes [37]. Dans le sol et la rhizosphère, les bactéries utilisent la chitine à partir des insectes et des champignons comme source de carbone et d'azote [38,39]. Pour cela, le bio-contrôle des insectes et des champignons en ciblant leur morphologie chitineuse apparaît une approche prometteuse. En effet, la membrane/matrice péritrophique des intestins d'insectes est composée de 3-13% de chitine d'un polymère linéaire de b-1,4-N-acétylglucosamine (GlcNAC), tandis que les cuticules des insectes peuvent contenir jusqu'à 40% de chitine sur une base de masse sèche [40, 41]. Les chitinases microbiennes affaiblissent et dégradent les parois cellulaires de nombreux parasites et agents pathogènes, présentant ainsi une activité antibactérienne, antifongique, insecticide et nématicide [42]. Par ailleurs, la majorité des lipases utilisées à des fins biotechnologiques ont été isolées de bactéries et de champignons [43]. En effet, les lipases sont des enzymes ubiquistes que l'on retrouve aussi bien chez les organismes inférieurs tels que les bactéries, les champignons ou levures que chez les organismes supérieurs tels que les plantes et les animaux. Elles sont capables de catalyser l'hydrolyse d'esters glycérides en milieu aqueux et la synthèse d'esters en milieu non aqueux [44, 45].

Goswami *et al.* [46], ajoutent que la lipase (triacylglycérolacyl hydrolase ; EC 3.1.1.3) est une classe d'enzymes qui catalysent l'hydrolyse du triacylglycérol et / ou l'estérification entre le glycérol et l'acide gras. Les lipases bactériennes sont classées en huit familles différentes en fonction de la séquence d'acides aminés et des propriétés biochimiques [47] et peuvent jouer un rôle de facteurs de virulence [48]. L'activité de sécrétion de lipase et la pathogénicité sont généralement positivement corrélées chez le champignon entomopathogène *Beauveria bassiana* [49, 50, 51]. Enfin de grands dépôts de lipides sont stockés dans le corps adipeux des insectes, principalement sous forme de TAG [52]. Il s'avère à la lumière de notre étude, qu'il existe une étroite relation entre la toxicité enregistrée chez les larves de *D. oleae* et les métabolites secondaires produites par les souches testées en l'occurrence les chitinases et les lipases.

CONCLUSION

Dans la région méditerranéenne, la mouche de l'olive *Dacus oleae* est le ravageur le plus redoutable de la culture de l'olivier. La viabilité des agents de contrôle biologique contre cette mouche devrait diminuer la plupart des problèmes environnementaux liés à l'utilisation des insecticides chimiques. C'est dans ce sens que s'inscrit notre travail. Un nombre de 22 rhizobactéries du genre *Bacillus*, ont été isolées de deux oliveraies situées dans deux régions ; Béjaïa et Boumerdes. Ces souches ont fait l'objet d'une étude phénotypique indiquant une grande variabilité, avec une production importante d'enzymes hydrolytiques. D'autre part, l'étude du pouvoir entomopathogène des bactéries isolées à l'égard des larves de 5^{ème} stade de la mouche de l'olive *Dacus oleae* a révélé des résultats très encourageants. En effet, des tests préliminaires réalisés sur les 22 isolats, nous ont permis de sélectionner impérativement les plus performantes. Des taux de mortalité très significatifs ont été consignés dans un temps ne dépassant pas 48h. Les résultats de cette étude fourniront les connaissances clés nécessaires à l'application future des souches indigènes contre la mouche de l'olive en Algérie. De plus, les applications futures impliqueront l'identification exacte des bactéries isolées avec la détermination de leur mode d'action afin de pouvoir en fabriquer un produit industriel pour les applications à grande échelle.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1]. **Daane K.M. & Johnson M.W. (2010)**. Olive fruit fly: managing an ancient pest in modern times. *Annu. Rev. Entomol.*, 55, 151–169.
- [2]. **Tzanakakis M.E. (2006)**. *Insects and Mites Feeding on Olive: Distribution, Importance, Habits, Seasonal Development and Dormancy*. Brill Academic, Leiden. 204 p.
- [3]. **Gucci R., Caruso G., Canale A., Loni A., Raspi A., Urbani S., Taticchi A., Esposto S. & Servili M. (2012)**. Qualitative Changes of Olive Oils Obtained from Fruits Damaged by *Bactrocera oleae* (Rossi) *Hortscience*, 47(2):301–306. 2012.
- [4]. **Marouf A., AbbasiMozhdehi M., Taghaddosi M. & Keyhanian A. (2017)**. Chemical Ecology, Behavior, Social Insects & Integrated Pest Management A preliminary study on the effect of olive fruit fly damage on quality of olive oil. Conference paper. 2nd Iranian International Congress of Entomology, September 2-4, 2017
- [5]. **Herth A. (2011)**. *Le bio-contrôle pour la protection des cultures. 15 recommandations pour soutenir les technologies vertes*. Rapport au Premier ministre François Fillon, France. 154p.
- [6]. **Nautiyal C.S. (2001)**. Biocontrol of plant diseases for agricultural sustainability. ISBN : 978-1-4613-6889-2
- [7]. **Glick B.R. (1995)**. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Canadian Journal of Microbiology*, 41(2), 109-117.
- [8]. **Oulebsir-Mohand Kaci H. & Doumandji-Mitiche B. (2012)**. Étude de l'impact biologique de *Pseudomonas* spp. fluorescents sur les métabolites hémolyphatiques et l'histologie du tube digestif des larves L5 du criquet migrateur *Locusta migratoria* (Linné, 1758). *Lebanese Science Journal*, 13(2) :99-107.
- [9]. **Kim D.S., Cook R.J. & Weller D.M. (1997)**. *Bacillus* sp. L324-92 for biological control of three root diseases of wheat grown with reduced tillage. *Phytopathology*, 87(5): 551-558.
- [10]. **Ben Khedher S., Boukedi H., Dammak M., Kilani-Feki O., Sellami-Boudawara T., Abdelkefi-Mesrati L. & Tounsi T. (2017)**. Combinatorial effect of *Bacillus amyloliquefaciens* AG1 biosurfactant and *Bacillus thuringiensis* Vip3Aa16 toxin on *Spodoptera littoralis* larvae. *Journal of Invertebrate Pathology*, 144 (2017) 11–17.
- [11]. **Oulebsir-Mohand Kaci H., Tihar-Benzina F. & Mohammadi A. (2019)**. Study of Some Biocontrol Bacterial Isolates and Evaluation of Their Antifungal and Insecticidal Effects. *International Journal of Innovative Approaches in Agricultural Research*, 3(2): 332-342.
- [12]. **Shi W. & Tan S. (2019)**. Current Status and Trend on Grasshopper and Locust Biological Control. *Chinese Journal of Biological Control*, 35(3):307-324
- [13]. **Bravo A., Likitvivatanavong S., Gill S.S., & Soberón M. (2011)**. *Bacillus thuringiensis*: a story of a successful bioinsecticide. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 41: 423–431.
- [14]. **Davet P. & Rouxel F. (1997)**. Détection et isolement des champignons du sol. Eds. INRA, Paris. France. 194 p.
- [15]. **Karungu S., Huang D., Atoni E., Waruhiu C., Agwanda B., Hu X., & Yuan Z. (2018)**. Isolation, identification and evaluation of mosquito entomopathogenic *Bacillus* species and related genera from randomly selected sites in Kenya. *African Journal of Microbiology Research*, 12(12):290-299.
- [16]. **Wolkers W.F. & Oldenhof H. (2015)**. *Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols, Methods in Molecular Biology*, vol. 1257, DOI 10.1007/978-1-4939-2193-5_1, © Springer Science+Business Media New York 2015
- [17]. **Joffin J.N. & Leyral G. (2006)**. *Microbiologie technique TI-Dictionnaire des techniques*. 4^{ème} édition. Bordeaux: CRDP d'aquitaine. 368 p.
- [18]. **Guiraud J.P. (2003)**. *Microbiologie Alimentaire*. Edition DUNOD. Paris. pp : 136-139
- [19]. **Delarras C. (2007)**. *Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyses ou de contrôle sanitaire: Aliments, produits cosmétiques, eaux, produits pharmaceutiques*. Édition Médicales Internationales, Lavoisier 476 p.
- [20]. **Saleki-Gerhardt A., Ahlneck C. & Zograf G. (1994)**. Assessment of disorder in crystalline solids. *Int J Pharm*, 101:237–247.
- [21]. **Mortier E., Jager S., Gerdolle D. & Dahoun A. (2011)**. La microscopie électronique à balayage environnementale : application à l'observation des tissus dentaires minéralisés. *Actualités Odonto-Stomatologiques*; 254:221-229. DOI: 10.1051/aos/2011305© AEOS / EDP Sciences.
- [22]. **Kalab M., Yang A.F. & Chabot D. (2008)**. Conventional Scanning Electron Microscopy of Bacteria. *Infocus*, 10 (44-61). DOI: [10.22443/rms.inf.1.33](https://doi.org/10.22443/rms.inf.1.33)
- [23]. **Smibert R.M. & Krieg N.R. (1994)**. Phenotypic characterization. In: Methods for general and molecular bacteriology. P. Gerhardt, R. G. E. Murray, W. A. Wood, and N. R. Krieg (ed.), American Society for Microbiology, Washington, D.C. pp.607–654
- [24]. **De Vos P., Garrity G.M., Jones D., Krieg N.R., Ludwig W., Rainey F.A., Schleifer K.H. & Whitman W.B. (2009)**. *Bergey's Manual of systematic Bacteriology*, 2nd ed., The firmicute. Springer. New York. Volume 3.63-67.
- [25]. **Cooksey D.A., Azad H.R., Cha J.S. & Lim C.K. (1990)**. Copper resistance gene homologs in pathogenic and saprophytic bacterial species from tomato. *Appl. Environ. Microbiol.*, 56: 431-435.

- [26]. **Benine M.L., Bendaha M.L. & Abbouni B. (2012).** Optimisation of the Chitinase Production by *Serratia Marcescens* DSM 30121T and Biological Control of Locusts. *J Biotechnol Biomaterial*, 2:133. doi:10.4172/2155-952X.1000133
- [27]. **Tsitsipis J.A. (1977).** Development of a caging and egg system for mass rearing the olive fruit fly, *Dacus oleae* (Gmel.) (Diptera, Tephritidae). August 1977. *Journal of Applied Entomology*, 83(1-4):96 – 105.
- [28]. **Zhao N., Ge Y., Shi T., Hu X. & Yuan Z. (2014).** Collagen-like glycoprotein BclS Is involved in the formation of filamentous structures of the *Lysinibacillus sphaericus* *Exosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 80(21):6656-6663.
- [29]. **Euzeby J. (2007).** List of new names and new combinations previously effectively, but not validly, published. *Int J Syst Evol Microbiol*, 57(Pt 5), 893-897
- [30]. **Achouak W. & Sutra L. (2000).** *Pseudomonas brassicacearum* ap. nov. and *Pseudomonas thivervalensis* sp. nov., two root-associated bacteria isolated from *Brassica napus* and *Arabidopsis thaliana*. *Int. J. Syst. Evolution. Microbiol.* 50: 9-18.
- [31]. **Joung J. & Coté J. C. (2000).** Une analyse des incidences environnementales de l'insecticide microbien *Bacillus Thuringiensis*. Ed. AAC. Centre de recherche et développement en horticulture, Bulletin technique n.29, Canada.
- [32]. **Charles J.F. & Nielsen-Leroux C. (1996) :** Les bactéries entomopathogènes : Mode d'action sur les larves de moustiques et phénomènes de résistance. Article In Annales de l'Institut Pasteur/Actualités December 1996.
- [33]. **Gallet A. (2018).** Les conquêtes de l'INRA pour le biocontrôle. Revue INRA sciences impacts. Paris. France. 25 p.
- [34]. **Crickmore N., Zeigler D.R., Schnepf E., Van Rie J., Lereclus D., & Baum J. (2011).** 'Bacillus thuringiensis toxin nomenclature' [WWW document]. URL http://www.lifesci.sussex.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/.
- [35]. **Oulebsir-Mohand Kaci H., Khemili-Talbi S., Benzina F. & Halouane F. (2015).** Isolation and Identification of Entomopathogenic Bacteria from Algerian Desert Soil. Study of Their Effects Against Migratory Locust *Locusta migratoria*. *Egypt. J. Biol. Pest Control*, 25(3) :739-746.
- [36]. **Pagès S. & Ginibre N. (2006).** Evaluation de la virulence de bactéries entomopathogènes. Mise en place au laboratoire d'un bio essai reproductible en conditions contrôlées. *Cah. Tech. I.N.R.A.*, 57 : 11-19
- [37]. **Vidyalakshmi R., Paranthaman R. & Indhumathi. J. (2009).** Amylase Production on Submerged Fermentation by *Bacillus spp.* *World Journal of Chemistry*, 4 (1): 89-91.
- [38]. **Cohen-Kupiec R. & Chet I. (1998).** The molecular biology of chitin digestion. *Curr Opin Biotechnol*, 9: 270–277.
- [39]. **Geisseler D., Horwath WR. & Joergensen RG. (2010).** Pathways of nitrogen utilization by soil microorganisms--a review. *Soil Biol Biochem* 42: 2058–2067.
- [40]. **Toprak U., Erlandson M. & Hegedus D. (2010).** Peritrophic matrix proteins, *Trends Entomol.*, 6 :23-51
- [41]. **Wang S.L. & Hwang J.R. (2001).** Microbial reclamation of shellfish wastes for the production of chitinases, *Enzyme Microb. Technol.*, 28, 376e382.
- [42]. **Edreva A. (2005).** Pathogenesis-related proteins: research progress in the last 15 years. *Gen Appl Plant Physiol*, 31: 105–124.
- [43]. **Lin E.S., Wang C.C. & Sung S.C. (2006).** Cultivating conditions influence lipase production by the edible Basidiomycete *Antrodia cinnamomea* in submerged culture. *Enzyme Microb. Technol.*, 39, 98–102.
- [44]. **Reis P., Holmberg K., Watzke H., Leser M.E. & Miller R. (2008).** Lipases at interfaces: A review. *Advances in colloid and interface science*, 147(148):237-250
- [45]. **Gupta R., Gupta N. & Rathi P. (2004).** Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 64: 763-781.
- [46]. **Goswami D., Basu J.K. & De S. (2013).** Lipase applications in oil hydrolysis with a case study on castor oil: a review, *Crit. Rev. Biotechnol.*, 33 (1) 81–96.
- [47]. **Arpigny J. & Jaeger K. (1999).** Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties, *Biochem. J.*, 343:177–183.
- [48]. **Stehr F., Kretschmar M., Kroger C., Hube B. & Schafer W. (2003).** Microbial lipases as virulence factors. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 22: 347e355
- [49]. **Feng M. (1998).** Reliability of extracellular protease and lipase activities of *Beauveria bassiana* isolates used as their virulence indices. *Wei Sheng Wu XueBao*, 38: 461e467.
- [50]. **Kaur G. & Padmaja V. (2009).** Relationships among activities of extracellular enzyme production and virulence against *Helicoverpa armigera* in *Beauveria bassiana*. *Journal of Basic Microbiology*, 49: 264e274.
- [51]. **Robledo-Monterrubio M., Alatorre-Rosas R., Viniegra-Gonzalez G. & Loera O. (2009).** Selection of improved *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. strains based on 2-deoxy-D-glucose resistance and physiological analysis. *Journal of Invertebrate Pathology*, 101: 222e227.
- [52]. **Canavoso L.E., Jouni Z.E., Karnas K.J., Pennington J.E. & Wells M.A. (2001).** Fat metabolism in insects. *Annu. Rev. Nutrition*, 21: 23–46.