Revue Ezzaitouna 15 (1 et 2), 2019

CRIBLAGE ET IDENTIFICATION DES BACTERIES DANS LES OLIVERAIES TUNISIENNES ET DEPISTAGE DE LEUR ACTIVITE ENTOMOPATHOGENE

Houda Gharsallah[1], Ines Ksentini[1], Karama Hadj Taieb[1], Nour Abdelhedi[1], Sourour Naayma[1], Christina Schuster[2], Mohamed Ali Triki[1], Andreas Leclerque[2] et Mohieddine Ksantini[1]

Résumé

La présente étude comporte deux parties. La première a été réalisée en vue d'inventorier et d'identifier les bactéries associées aux ravageurs de l'olivier. La deuxième partie a porté sur le criblage de l'activité entomopathogène des bactéries identifiées afin de leur utilisation possible dans la lutte microbiologique. Cette activité a été évaluée sur les larves de la teigne de la farine *Ephestia kuehniella* (Lepidoptera: Phycitidae). Afin d'atteindre nos objectifs, des isolements bactériens ont été effectués, leur identification moléculaire a été réalisée, des cultures des bactéries à tester ont été préparées, un élevage d'*E.kuehniella* a été mené et puis une série de tests biologiques a été entreprise.

Les résultats des tests de pathogénie des bactéries sur les larves d'*E.kuehniella* ont montré le pouvoir entomopathogène important de *Providencia vermicola, Lysinibacillus* sp.*,Bacillus subtilis* et *Alcaligenes faecalis* qui s'est traduit par des taux de mortalité élevés. En revanche, les souches bactériennes appartenant aux genres *Staphylococcus, Brevundimonas* et *Myroides,* n'ayant montré aucune activité entomopathogène seraient symbiotes à l'insecte. L'activité entomopathogène de *Providencia vermicola, Lysinibacillus* sp.*, Bacillus subtilis* et *Alcaligenes faecalis* devraient être plus profondément étudiée en vue de leur utilisation possible dans la lutte microbiologique contre les ravageurs de l'olivier.

Mots clés: Bactéries, Activité entomopathogène

Abstract:

This study has two parts. The first was carried out in order to isolate and identify the bacteriaassociatedwith olive pests. The second part focused on the screening of the entomopathogenicactivity of the identifiedbacteria, in order to their possible use in microbiological control. This activitywasevaluated on the larvae of the Flour moth *Ephestia kuehniella* (Lepidoptera: Phycitidae). In order to achieve our objectives, bacterial isolations and their molecular identification were carried out. Bacterial cultures were prepared, a breeding of *E. kuehniella* was conducted, and then a series of bio assays were under taken.The results of bacterial pathogenesis tests on

[1] Laboratoire 'Ressources Génétiques de l'Olivier: Caractérisation, Valorisation et Protection Phytosanitaire', Institut de l'Olivier, Université de Sfax, Tunisie

[2] Institut de microbiologie et de biochimie de l'Université de Geisenheim, Allemagne.

E. kuehniella larvae showed the high entomopathogenic potency of *Providencia vermicola*, *Lysini bacillus* sp., *Bacillus subtilis* and *Alcaligenes faecalis* which resulted in high mortality rates. On the other hand, bacterials trains belonging to the genera*Staphylococcus*, *Brevundimonas* and *Myroides*, which have not show nany entomopathogenic activity, are said to besymbionts with the insect.
The entomopathogenic activity of *Providencia vermicola*, *Lysini bacillus* sp., *Bacillus subtilis* and *Alcaligenes faecalis* should befurther investigated for their possible use in the microbiological control of olive pests.

Keywords: Bacteria, Entomopathogenicactivity.

Introduction

L'oléiculture Tunisienne constitue l'un des principaux secteurs stratégiques de l'économie en général et de l'agriculture en particulier. Elle occupe 1,6 millions d'hectares, soit près du tiers des terres arables du pays. En termes de production, la Tunisie se range généralement parmi les six premiers producteurs mondiaux d'olive (FAOSTAT, 2018).

L'olivier présente une remarquable rusticité et une plasticité lui permettant de produire dans des conditions difficiles (adaptation à une large gamme de sol et au déficit hydrique). Cependant, sa productivité reste toujours limitée par plusieurs facteurs biotiques et abiotiques. Ceci se traduit par une baisse de production et une altération de la qualité d'huile qui reste difficile à commercialiser sur le marché mondial, malgré les progrès technologiques qu'a connu le secteur oléicole (Hobaya et Bendimerad, 2012).

Pour consolider la position du secteur oléicole en Tunisie et améliorer la compétitivité de l'huile d'oliveTunisienne à l'échelle internationale, l'effort devrait être axé sur la maitrise des coûts de production et l'amélioration de la qualité d'huile. Dans ce contexte, l'aspect phytosanitaire est considéré parmi les facteurs importants agissant aussi bien sur les charges de production que sur la qualité du produit (FAO et BERD, 2015).

En Tunisie, l'olivier est sujet principalement à l'attaque de trois ravageurs, à savoir, la mouche de l'olive *Bactrocera oleae* (Diptera, Tephritidae), la teigne de l'olivier *Prays oleae* (Lepidoptera, Yponomeutidae) et le psylle de l'olivier *Euphyllura olivina* (Hemiptera, Psyllidae) (COI, 2007). Ces ravageurs font l'objet de traitements chimiques qui peuvent être de caractère préventif et/ou curatif. Toutefois, face aux problèmes environnementaux et sanitaires causés par les insecticides chimiques, la lutte biologique est considérée comme piste envisageable pour parvenir à une agriculture à faible niveau d'intrants et à minimiser l'emploi des produits chimiques de synthèse (Warlop, 2006). C'est dans cette optique et dans le cadre de la valorisation de la biodiversité de l'agro-écosystème des oliviers, que l'Institut de l'Olivier a entrepris des recherches visant l'investigation et la valorisation des bactéries dans la lutte contre les insectes précités.

Matériel et méthodes

Isolement et culture des bactéries

L'isolement des bactéries a été effectué à partir de *B.oleae*, *P.oleae* et *E. olivina*, de leurs déjections, des feuilles et des grappes florales de l'olivier. Les échantillons ont été prélevés à partir de trois arbres de la variété « Chemlali » situées dans la région de Sfax. Cet isolement a été fait sur le milieu LB (Luria-Bertani) à partir des adultes des insectes.

Les adultes collectés à partir du matériel végétal infesté, ont été stérilisés en surface par l'éthanol à 70%. Ils ont été par la suite rincés par l'eau distillée stérile 3 fois puis séchés sur papier filtre stérile. Finalement, ces adultes ont été écrasés par un micro-pilon stérile après avoir ajouté 1 ml d'eau physiologique.100 µl de chaque solution ont été ensemencés et répartis sur la surface d'une boite de Pétri contenant sur la gélose LB appropriée pour l'isolement des bactéries.

2. Isolement à partir des organes de l'olivier et des déjections de l'insecte

10 g de feuilles et de grappes florales infestées et portant les déjections des insectes en question ont été homogénéisées au stomacher dans 100 ml d'eau distillée stérile pour constituer une solution mère, en suivant le protocole décrit par Fages et Mulard (1988). Des dilutions en série de 10^{-1}et 10^{-2}ont été par la suite effectuées à partir de la solution mère. L'isolement a été effectué sur le milieu LB comme précédemment décrit.

3. Identification des bactéries

L'extraction de l'ADN des bactéries a été effectuée en utilisant le kit DNeasyblood and tissue kit. L'ADN extrait a servi comme matrice pour amplifier la région 16S de l'ADN ribosomal. L'amplification par PCR a été effectuée en utilisant les deux amorces universelles complémentaires fD1: 7 (Amorce sens (fD1) AGAGTTTGATCCTGGCTCAG et rP2: 7 (Amorce anti-sens (rP2) ACGG (ACT) TACCTTGTTACGACTT). Le thermocycleur PCR System MyCyclerTM servant pour la réalisation des réactions PCR, a été programmée en un cycle initial de dénaturation à 95°C pendant 2 min, suivi de 40 cycles à 95°C pendant 30 sec, hybridation à 56°C pendant 30 s et polymérisation à 68°C pendant 3 min et terminant avec un cycle d'élongation à 68°C pendant 5 min. La purification des produits PCR a été faite en utilisant le kit PCR Purification Kit.

Les produits de PCR purifiés ont été par la suite séquencés. Les chromatogrammes obtenus ont été analysés au moyen de l'éditeur de séquences CHROMAS. Une amélioration manuelle a été faite pour les séquences manquantes de quelques acides nucléiques. L'alignement séquentiel a été conduit à l'aide du logiciel MEGA7. Les séquences nucléiques des isolats ont été analysées pour leur indice de similarité par l'outil de recherche de base d'alignement en ligne BLAST

(http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) qui permet de comparer les séquences avec celles disponible dans la base de données de la GenBank (NCBI).

Criblage de l'activité entomopathogène

Toutes les bactéries isolées ont été criblées pour leur activité entomopathogène en se basant sur des traitements effectués sur la teigne de la farine *Ephestia kuehniella* (Lepidoptera : Pyralidae), activement employée à travers le monde pour déceler l'activité entomopathogène.

4.1. Elevage d'*Ephestia kuehniella*

L'élevage a été maintenu au laboratoire dans des conditions contrôlées (une température de 25°C et une photopériode égale à 16h d'éclairage). Le dispositif d'élevage a été mis dans des boites en plastique recouvertes de mousseline pour avoir une bonne aération. Après leur émergence, les adultes ont été déposés dans des bouteilles en plastique, recouvertes d'un morceau de mousseline maintenu par un élastique. Un morceau de coton imbibé de miel dilué, utilisé comme source de nutrition, a été déposé sur chaque bouteille.Ces derniers ont été transférés et ensemencés, sous les conditions ambiantes, dans de nouvelles boites contenant de la semoule stérile tout en notant la date. Les boites ont été contrôlées pour l'éclosion des œufs et l'évolution des larves afin de prélever les larves L2 et L4 objet des tets effectués.

4.2. Tests biologiques

Un total de 52 isolats bactérien a été utilisé dans cet essai. Pour chaque isolat, une pré-culture de 24h puis une culture de 5h ont été préparées dans un bouillon LB. Par la suite, 500 µl de l'inoculum ont été pulvérisés dans chaque boite de Pétri contenant déjà 1 g de semoule autoclavée. Des larves traitées par du bouillon de LB ont servi de témoin. Après 24h de séchage à l'air libre, le broyage de la semoule a été effectué à l'aide d'un mortier stérile. Ensuite, les larves du stade L2 ont été transférées dans la semoule traitée. Les essais ont été effectués à raison de 10 larves/ traitement, soit trois répétitions pour chaque essai. Les boites ont été mises à la température ambiante et examinées quotidiennement pour vérifier la mortalité des larves, jusqu'à 10 jours après le début du test. Il est important de mentionner que le jugement de la mortalité larvaire s'est basé d'une part sur le changement de la couleur et l'aspect de la larve et d'autre part sur sa mobilité. Cette dernière a été vérifiée grâce à une stimulation mécanique par une pince entomologique stérile.

5. Méthodes analytiques

Pour des fins statistiques, l'activité entomopathogène des différents isolats a été estimée par l'analyse du taux de mortalité des insectes traités. Pour élucider les effets des traitements, une analyse de la variance (ANOVA) a été utilisée pour détecter les différences selon le Test de Tukey ($p < 0,05$). Les analyses ont été faites en utilisant le logiciel statistique SPSS 17 version 2008.

Résultats et discussion

1. Biodiversité bactérienne

Les séquences obtenues suite à l'analyse des 52 échantillons isolés ont été comparées à des séquences de référence accessibles sur la base des données de la banque des gènes. Nos résultats ont montré que les 52 isolats appartiennent aux 10 genres suivants : *Bacillus* sp., *Staphylococcus* sp., *Brevibacterium* sp., *Providencia*s p. *Enterobacteriaceae*s p., *Brevundimonas* sp., *Alcaligenes*sp., *Serratia* sp., *Lysinibacillus* sp. et *Myroides*sp (Figure 1).

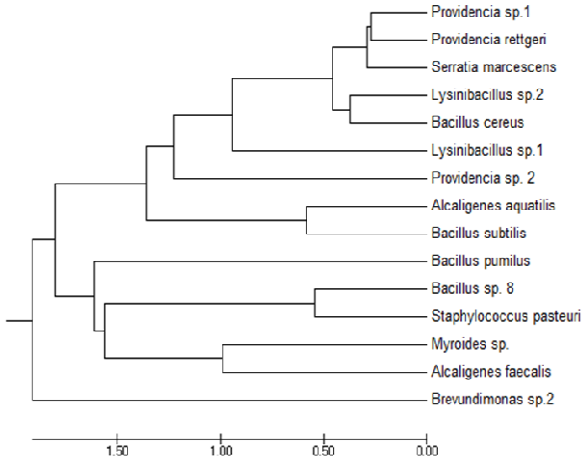

Figure 1: Dendrogramme montrant les relations génétiques entre quelques espèces collectées ; Seuil de coupure : déterminant les classes

À une distance de 0.5, le dendrogramme réparti les 15 espèces en 11 classes distinctes, dont 2 sont vraies contenant chacune 2 et 3 isolats et 10 singletons. L'abondance des espèces bactériennes isolées a montré que *Bacillus* sp. est l'espèce la plus abondante avec 26,92 % du total des isolats, suivie par *Alcaligenes*sp. avec une fréquence supérieure à 17%. Par contre, d'autres espèces telles que *Providencia*sp.et *Lysinibacillus*sp. ont été rencontrées à une fréquence plus faible (respectivement 5,77 et 3,85 %).

2. Evaluation de l'activité entomopathogène des isolats bactériens sur les larves de *E. kuehniella*

Les bactéries isolées dans la présente étude ont été testées pour leur effet entomopathogène contre les larves d'*E. kuehniella* en se basant sur le taux de mortalité des insectes traités (Figure 2)

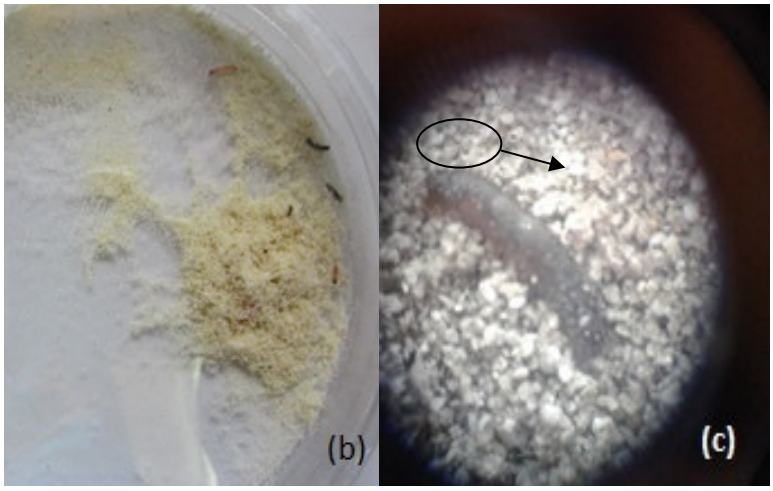

Figure 2: Test de l'activité entomopathogène ; (b): larves mortes reconnaissable par leur noircissement ; (c): observation optique d'une larve d'*E. kuehniella* traité par *Providencia vermicola*.

L'analyse des données expérimentales montre que la plus forte mortalité larvaire a été provoquée par la bactérie *Providencia vermicola*s. Cette bactérie a engendré la mortalité totale des larves traitées. Toutefois, la plus faible mortalité a été enregistrée par les bactéries *Myroides*sp. et *Brevundimonas*sp. avec un taux de mortalité qui n'a pas dépassé 7,5% (Figure 3).

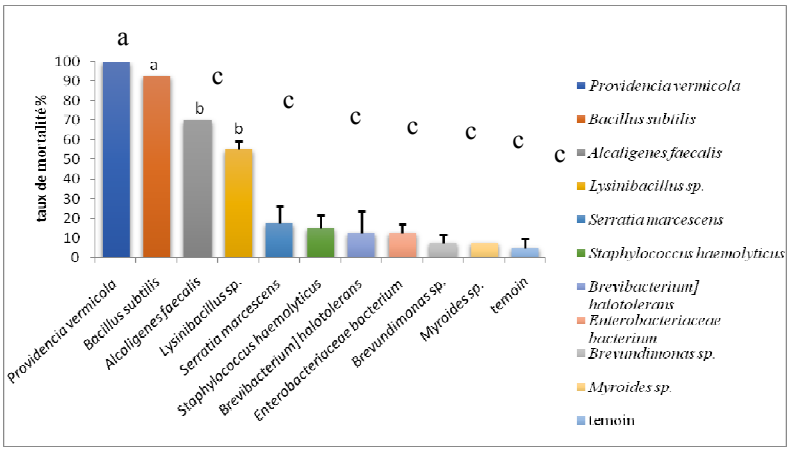

Figure 3: Taux de mortalité des larves L2 d'*Ephestia kuehniella* une semaine après leur infection (les rectangles avec des lettres différentes sont significativement différent)

Nos résultats montrent des différences significatives de l'activité entomopathogène des bactéries (p<0,05). En fait, 25 des 52 isolats bactériens testés ont induit plus de 50% de mortalité des larves d'*E. kuehniella* après

10 jours d'application. En effet, *Bacillus subtilis* et *Alcaligenes faecalis* ont engendré une mortalité relativement élevée respectivement de l'ordre de 92 et 70% (Figure 3). Par contre, un taux de mortalité larvaire moyen, de l'ordre de 55%, a été obtenu après le traitement de la semoule par *Lysinibacillus*sp., par contre les bactéries *Serratia marcescens, Enterobacteria ceaebacterium* et *Brevibacterium halotolerans* ont provoqué de faibles taux de mortalité compris entre 12,5 et 17,5 %.

En tenant compte du stade de développement de l'insecte, les jeunes larves (L2) ont été plus sensibles aux isolats bactériens que les larves âgées (L4) (Figure 4). Ces résultats sont similaires à ceux obtenus par Bateman et *al*. (1997) qui ont trouvé que les jeunes stades larvaires sont plus vulnérables à l'infection par les microorganismes.

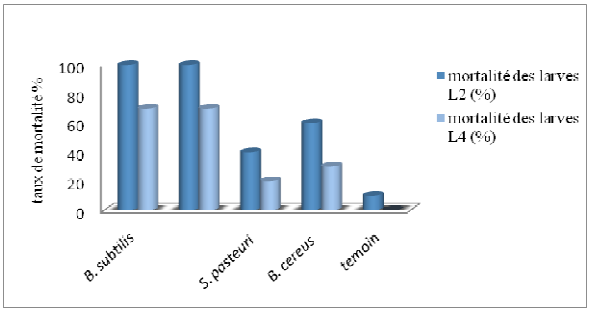

Figure 4: Comparaison du taux de mortalité entre les stades jeunes (L2) et âgés (L4) d'*E. kuehniella* obtenus après dix jours du début de l'essai.

Au terme du criblage de l'activité entomopathogène des bactéries sur les larves de *E. Kuehniella*, il est important de rappeler que l'activité entomopathogène détectée chez certaines bactéries devrait être confirmée contre la mouche de l'olive *Bactrocera oleae*, la teigne de l'olivier *Prays oleae* et le psylle de l'olivier *Euphyllura olivina*. Dans ce cas, ces bactéries pourraient être impliquées dans la lutte contre ces ravageurs, seulement dans la mesure où elles ne présenteraient aucun effet néfaste sur la faune auxiliaire, les plantes cultivées et les consommateurs.

La figure 5 illustre un exemple de test de mortalité des larves d'*E. kuehniella* dix jours après l'inoculation de leur substrat nutritif par les différentes espèces isolées appartenant au genre *Bacillus.*

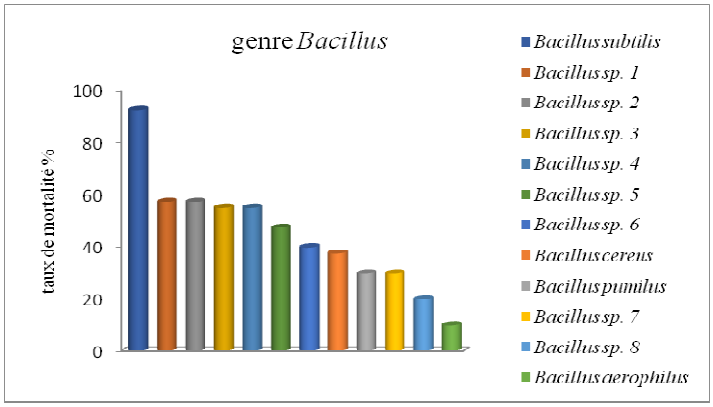

Figure 5: Taux de mortalité des larves d'*E. kuehniella*, dix jours après l'inoculation de leur substrat nutritif par les différentes espèces isolées appartenant au genre *Bacillus* (en %)

Nos résultats montrent qu'à part *B. subtilis* qui provoque le meilleur taux de mortalité larvaire, comme nous l'avons déjà mentionné précédemment, le pourcentage de mortalité de presque plus que la moitié des espèces testées se situe entre 40 et 60%. Toutefois, à l'instar de *B. subtilis*, d'autres espèces comme *B. thuringiensis* et *B. sphaericus* sont parmi les plus connues et utilisées à travers le monde dans la lutte contre les larves des insectes nuisibles aux cultures et les moustiques respectivement. En effet, *B. thuringiensis* et *B.sphaericus* produisent des toxines protéiques regroupées dans des cristaux, tuant spécifiquement les larves d'insectes nuisibles ou vecteurs de maladies. Bien que le mode d'action de ces toxines ne soit pas totalement élucidé, 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 (Charles et Nielsen-Le Roux, 1996). Également, d'autres espèces bactériennes appartenant au genre *Bacillus* utilisant des mécanismes d'action autre que celui de*B. thuringiensis,* peuvent également protéger les plantes. Il y a, parmi ces espèces, des souches de *B.licheniformis*, *B.amyloliquefaciens* ou *B. subtilis* (Pérez-Garcia et al., 2011).

Conclusion

En Tunisie, l'exploitation des bactéries entomopathogènes est encore un domaine émergent et tous les aspects liés semblent intéressants et innovants. Nos recherches peuvent fournir des données nécessaires à l'étude de ces agents de régulation naturelle des insectes en général, et des ravageurs de l'olivier en particulier, dans l'objectif de leur intégration dans les stratégies de protection biologique et intégrée.

L'isolement des bactéries a été effectué à partir des trois principaux ravageurs et des organes infestés de l'olivier. Nous avons isolé et identifié des

bactéries associées à trois ravageurs de l'olivier (*Bactrocera oleae*, *Prays oleae* et *Euphyllura olivina*) en vue de leur utilisation dans un programme de lutte biologique pour la protection de l'olivier. L'isolement effectué a mis en évidence l'existence de plusieurs souches bactériennes, dont certains ont montré une activité entomopathogène. En effet, l'identification moléculaire des bactéries a montré que ces insectes sont associés à 10 genres bactériens différents : *Bacillus* sp., *Staphylococcus* sp.,*Brevibacterium*sp.,*Providencia*sp. *Enterobacteriaceae*sp., *Brevundimonas*sp., *Alcaligenes*sp., *Serratia* sp., *Lysinibacillus*sp. et *Myroides* sp..

L'interaction bactérie-insecte peut être mutualiste (symbiose) ou antagoniste (parasitaire). Nos résultats prouvent que certaines bactéries sont entomopathogènes, telles que *Providencia vermicola, Lysinibacillussp.,Bacillus subtilis* et *Alcaligenes faecalis* qui peuvent être impliquées dans la protection de l'olivier. Les potentialités entomopathogènes de ces bactéries devraient être plus profondément explorées afin de leur utilisation possible pour la protection de l'olivier.

Références bibliographiques:

Bateman R.P., 1997. The development of a mycoinsecticide for the control of locusts and grasshoppers. *Outlook Agric*, 26, 13-18.

Charles J.F., Nielsen-Le Roux C., 1996. Les bactéries entomopathogènes : mode d'action sur les larves de moustiques et phénomènes de résistance. Annales de l'Institut Pasteur. Actualités 7 (4), 233-245.

COI, 2007. Conseil oléicole international, 2007 : Saavedra M.S. (Espagne), Tombesi A., Tombesi S. (Italie), Andria R., Lavini A. (Italie), Fernández-Escobar R. (Espagne) et Jardak T. (Tunisie): Techniques de production en oléiculture, 346 p. Coordination : Mohammed Ouhmad Sbitri et Francesco Serafini.

Fages J. et Mulard D., 1988. Isolement de bactéries rhizosphériques et effet de leur inoculation en pots chez *Zeamays.* Agronomie 4, 309-314.

FAOSTAT, 2018. http://www.fao.org/home/fr (Consulté le 15.10.2020).

FAO et BERD, 2015. Tunisie : Analyse de la filière oléicole. Etude préparée dans le cadre du programme de coopération entre l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO) et la Banque européenne pour la reconstruction et le développement (BERD), I4104F/1/06.15 (Italie), 186 p.

Hobaya O. et Bendimerad M., 2012. Contribution à l'étude des ravageurs de l'Olivier (*Olea europaea)* à Tlemcen. Projet de fin d'études d'ingénieur d'état en Agronomie. Option : Production et Amélioration Végétales, Faculté des

sciences de la nature et de vie et des sciences de la terre et de l'univers, Université Aboubekr Belkaid– Tlemcen, 87 p.

Pérez-García A., Romero D. & de Vicente A., 2011. Plant protection and growth stimulation by microorganisms: biotechnological applications of Bacilli in agriculture. Curr. Opin. Biotechnol., 22(2), 187-193.

Warlop, 2006. Limitation des populations de ravageurs de l'olivier par le recours à la lutte biologique par conservation. Cahiers Agricultures 15 (5, 449-455).