

Bacou Nolwenn
Nodet Garcia Abigail
Berthelot Maëlyse
Bertrand Alix

Dominante SVT
Dominante BIOTECHNOLOGIE
MIXTE
Surligner ou entourer la dominante du TIPE

BANQUE	AGRO-VETO
Filière	TB - Session 2026

T.I.P.E.

IMPORTANT : Aucune référence à l'établissement scolaire ne doit figurer ni sur cette couverture ni sur la fiche de présentation.

TITRE : <u>La protection de plants de moutarde blanche par <i>Bacillus subtilis</i></u>
--

La moutarde blanche est une plante largement cultivée appartenant à la famille des Brassicacées. Elle présente un intérêt agronomique important, notamment en agriculture pour la production de graines, mais aussi en tant que plante de couverture. Cependant, cette culture est sensible à diverses maladies, dont certaines d'origine bactérienne. Parmi elles, la nervation noire, causée par *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, constitue une problématique majeure.

Les symptômes de cette maladie sont caractéristiques : les feuilles présentent des lésions qui évoluent progressivement jusqu'à leur déchirure, les tiges développent des taches brunes, et les vaisseaux conducteurs de la plante noircissent. Cette altération du système vasculaire perturbe le transport de l'eau et des nutriments, ce qui entraîne un affaiblissement général de la plante. L'infection peut survenir à différents stades du cycle de vie : dès le semis, pendant la croissance végétative, mais également lors de la formation des graines[4].

Actuellement, les méthodes de prévention reposent principalement sur des pratiques culturales. Il est recommandé de détruire les plants infectés ainsi que leurs repousses afin de limiter la propagation de la bactérie. De plus, la rotation des cultures est essentielle : il est conseillé d'attendre au moins trois ans avant de replanter des Brassicacées sur une même parcelle [1]. Ces mesures permettent de réduire la présence de la bactérie dans le sol. Par ailleurs, des traitements chimiques, tels que les pesticides, peuvent être utilisés pour lutter contre l'infection. Cependant, ces solutions présentent plusieurs limites : elles peuvent entraîner une pollution de l'environnement et favoriser l'apparition de résistances bactériennes, rendant les traitements de moins en moins efficaces.

Dans ce contexte, il apparaît pertinent de rechercher des alternatives plus durables et respectueuses de l'environnement. Notre projet s'inscrit dans cette démarche, en étudiant une solution biologique basée sur l'utilisation de la bactérie *Bacillus subtilis*. Cette bactérie est connue pour produire des substances antimicrobiennes, notamment des antibiotiques et des lipopeptides, capables d'inhiber la croissance de certains agents pathogènes. Des études antérieures suggèrent que *Bacillus subtilis* pourrait limiter le développement de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* [2].

L'objectif de ce travail est donc d'évaluer l'efficacité de *Bacillus subtilis* dans la réduction des symptômes de l'infection par *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* sur la moutarde blanche. Plus précisément, il est intéressant d'observer la surface des zones infectées au niveau des feuilles, des tiges et des racines. L'hypothèse principale est que la présence de *Bacillus subtilis* permettrait de diminuer l'intensité des symptômes causés par la bactérie pathogène

Sommaire :

I. La bactérie *Bacillus subtilis* inhibe-t-elle la croissance de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in vitro ? (p.2)

II. La bactérie *Bacillus subtilis* protège-t-elle les plants de moutarde contre l'infection par *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* ? (p.3)

- 1) Principe de l'expérience (p.3)
- 2) Résultats concernant les symptômes de l'infection (p.5)
- 3) Mesure des surfaces racinaires.(p.6)
- 4) Résultats concernant la surface foliaire (p.8)

I. La bactérie *Bacillus subtilis* inhibe-t-elle la croissance de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in vitro ?

Cette expérience avait pour but d'étudier l'inhibition de *Bacillus subtilis* sur *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* au laboratoire. Cette expérience consiste donc à réaliser des tapis bactériens de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* sur une gélose, puis réaliser un puits au milieu de cette gélose afin d'y mettre une suspension de *Bacillus subtilis*. Les concentrations utilisées ont été déterminées au spectrophotomètre avec des valeurs d'atténuation trouvées dans la publication [3].

Cependant, cette expérience n'a pas fourni de résultats exploitables, en raison d'une absence de croissance bactérienne et de contaminations dans les boîtes de Pétri. Cette expérience a été réalisée une seconde fois en remplaçant les puits par des disques imbibés de suspension de *Bacillus Subtilis* n'ayant pas été diluée (concentration: $2,0 \cdot 10^7$ cellules/mL) et en utilisant différentes dilutions de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. Chaque dilution a été répétée 6 fois afin d'avoir un résultat significatif.

Figure 1: schéma du protocole de l'expérience in vitro et résultats attendus

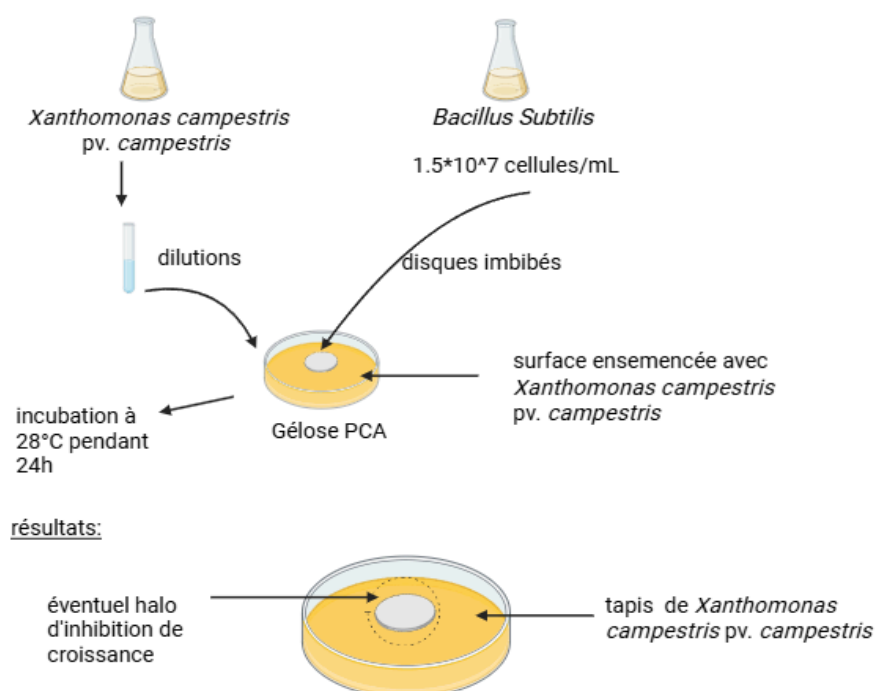
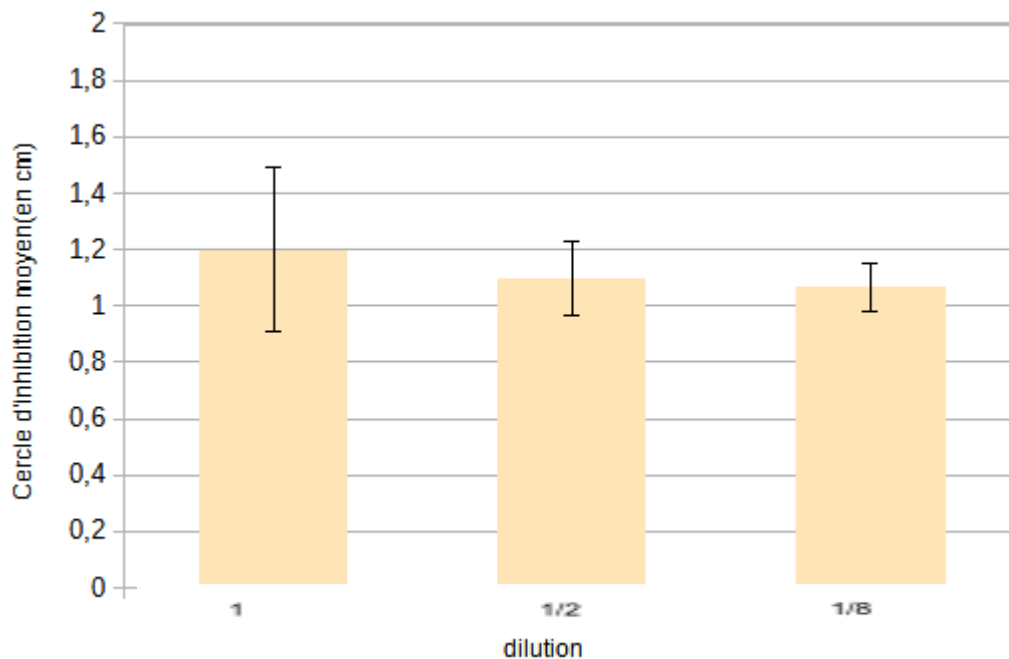


Figure 2: Taille des cercles d'inhibition en fonction de la dilution de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*



Les résultats ne montrent aucune différence significative en fonction des dilutions. Cependant, l'efficacité de *Bacillus subtilis* à inhiber la croissance de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* est quand même observée en raison de la présence de cercles d'inhibition d'environ 1.1 cm en moyenne.

II. La bactérie *Bacillus subtilis* protège-t-elle les plants de moutarde blanche contre l'infection par *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* ?

1) Principe de l'expérience

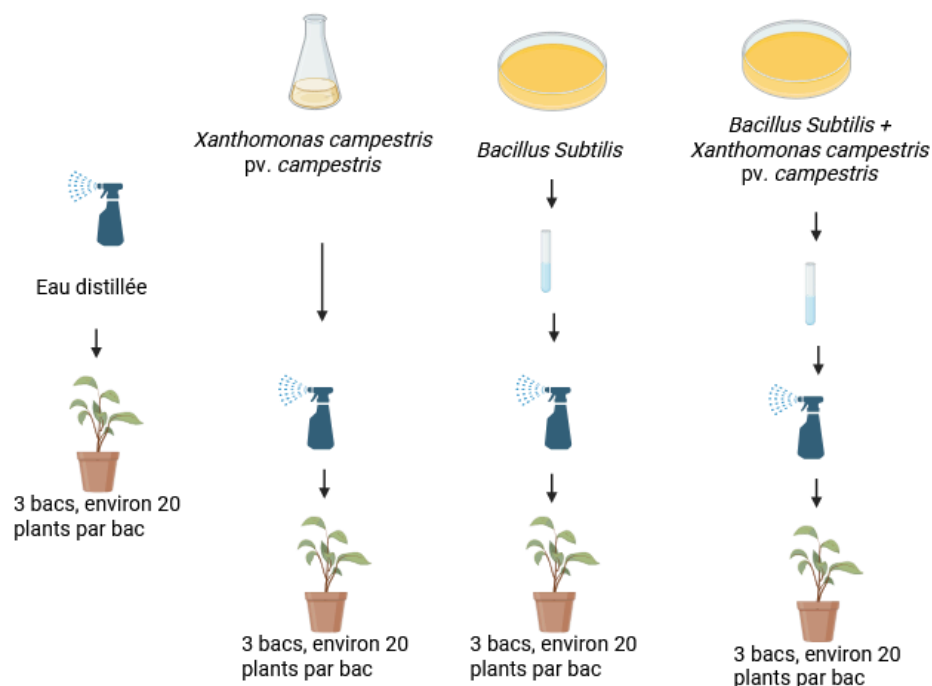
La période d'expérimentation a débuté par le prélèvement de la terre dans le champ du domaine agricole du lycée. Cette terre majoritairement argileuse a été stérilisée à l'aide d'un autoclave afin d'éliminer tous les micro-organismes présents. Cette terre a par la suite été mélangée avec du terreau non stérile pour obtenir une terre riche en minéraux et en matière organique, favorable à la croissance des plantes.

Douze bacs de culture ont été préparés et remplis avec ce mélange. Dans chacun de ces bacs, cinquante graines de moutarde blanche ont été semées à $t=0$ jours afin d'obtenir un nombre suffisant de plants pour les observations. Les bacs ont ensuite été répartis en quatre groupes de trois, correspondant à différentes conditions expérimentales.

L'inoculation des bactéries a été réalisée à l'aide de vaporisateurs contenant des suspensions bactériennes à des concentrations définies. Pour *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, la concentration (ayant été calculé grâce aux calculs présentés en Annexe) était égale à $9,5 \cdot 10^6$ cellules/mL, et pour *Bacillus subtilis*, la concentration était égale à $4,62 \cdot 10^6$ cellules/mL. Les suspensions ont été pulvérisées sur les feuilles (faces supérieure et

inférieure) ainsi que sur le sol, afin de maximiser les chances d'infection. Pour le groupe témoin, seule de l'eau a été utilisée.

Figure 3: schéma du protocole de l'infection des plantes



Une analyse de chaque plante a été réalisée à t=63 jours en prenant des photographies de six feuilles par bac ainsi que 3 racines par bac. Ces images ont ensuite été utilisées pour mesurer les surfaces foliaires et racinaires et évaluer l'étendue des symptômes, grâce à l'application Mesurim 2.

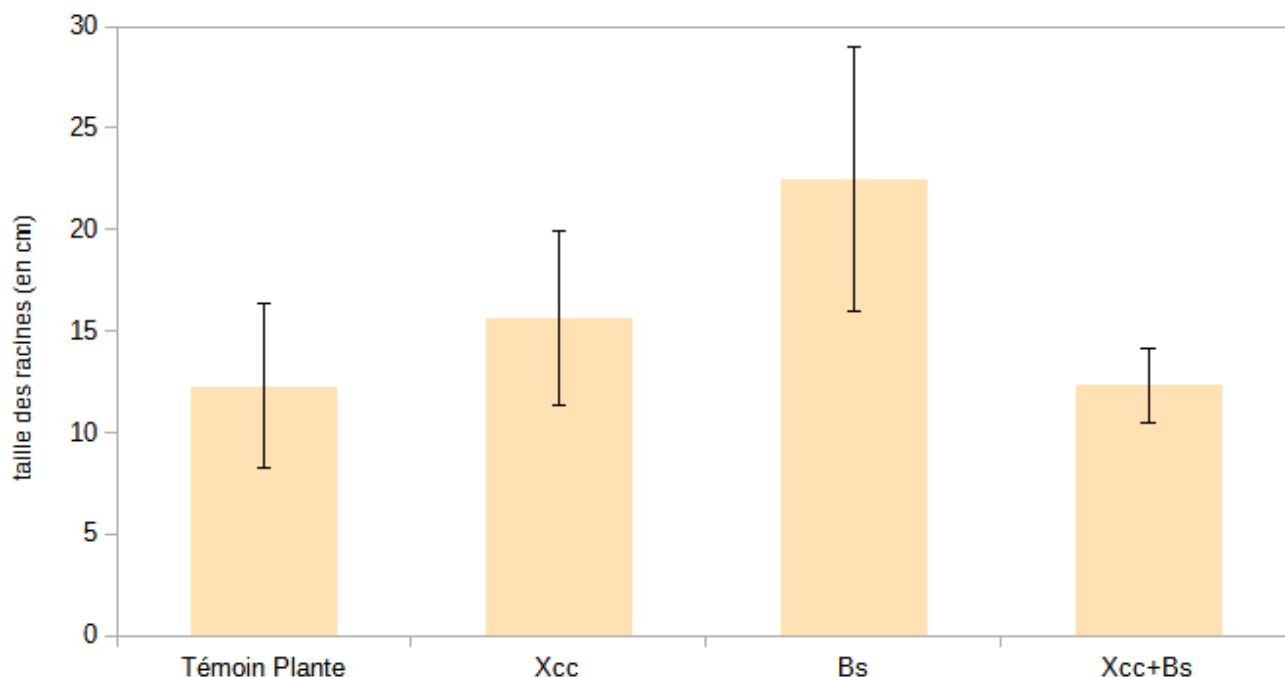
2) Résultats concernant les symptômes de l'infection

A la fin de notre expérience, nous avons obtenu des plantes violettes, sûrement dûes à une surexposition à la lumière. De plus, il a été remarqué que les résultats de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* n'ont pas produit les effets escomptés. En effet, nous n'avons pas observé les symptômes classiques de la nervation noire sur les plantes. Il est possible que la faible concentration ($4,62 \cdot 10^6$ cellules.mL) de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* inoculée qui a été obtenue expérimentalement en laboratoire, explique l'absence de résultats. Une autre raison plausible serait le manque d'humidité dans l'atmosphère, en effet aucun milieu à l'atmosphère humide n'a pas été reconstitué, pour autant l'humidité est un facteur clé favorisant le développement de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*.

3) Mesure des surfaces racinaires.

Ces mesures ont été réalisées à partir de photographie de l'appareil racinaire de trois plants par bacs, et par l'utilisation du site Mesurim2 afin de compter le nombre de ramifications et de mesurer la racine la plus longue de chaque plante.

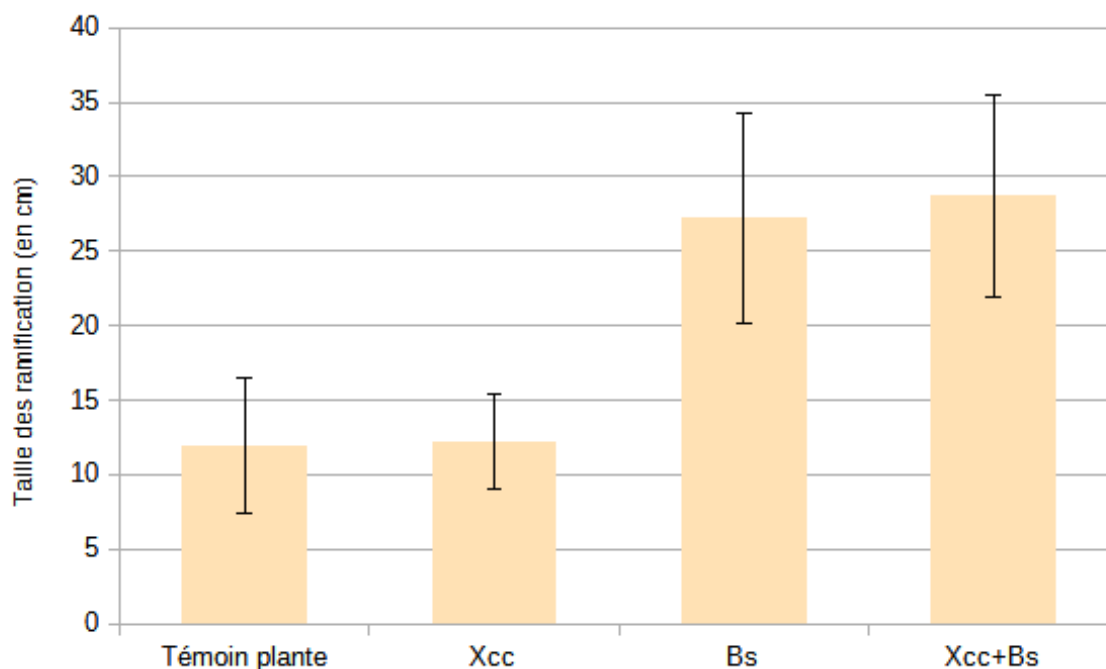
Figure 4: Effets de *Bacillus subtilis* et de *Xanthomonas campestris* pv *campestris* sur la longueur de la racine principale.



Les témoins non inoculés ont une racine principale de 13 cm en moyenne. Le groupe inoculé avec *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* a des racines principales de 15 cm en moyenne, cependant leur différence n'est pas significative. Pour le groupe inoculé avec *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* et *Bacillus subtilis* les plants ont une racine principale de 14 cm en moyenne mais cela ne représente pas une différence significative avec les deux groupes précédents. Le groupe inoculé avec *Bacillus subtilis* présente une racine principale de 23 cm en moyenne. Cette mesure présente une différence significative avec le groupe témoin mais pas avec le groupe *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*.

La présence de *Bacillus subtilis* favorise donc le développement des racines de la plante, elle permettrait donc à la plante de puiser les ressources nécessaires à sa croissance. Cependant, les effets de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* ne peuvent pas être prouvés en raison de l'absence de différence significative avec le témoin.

Figure 5: Effets de *Bacillus subtilis* et *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* sur la multiplicité des ramifications



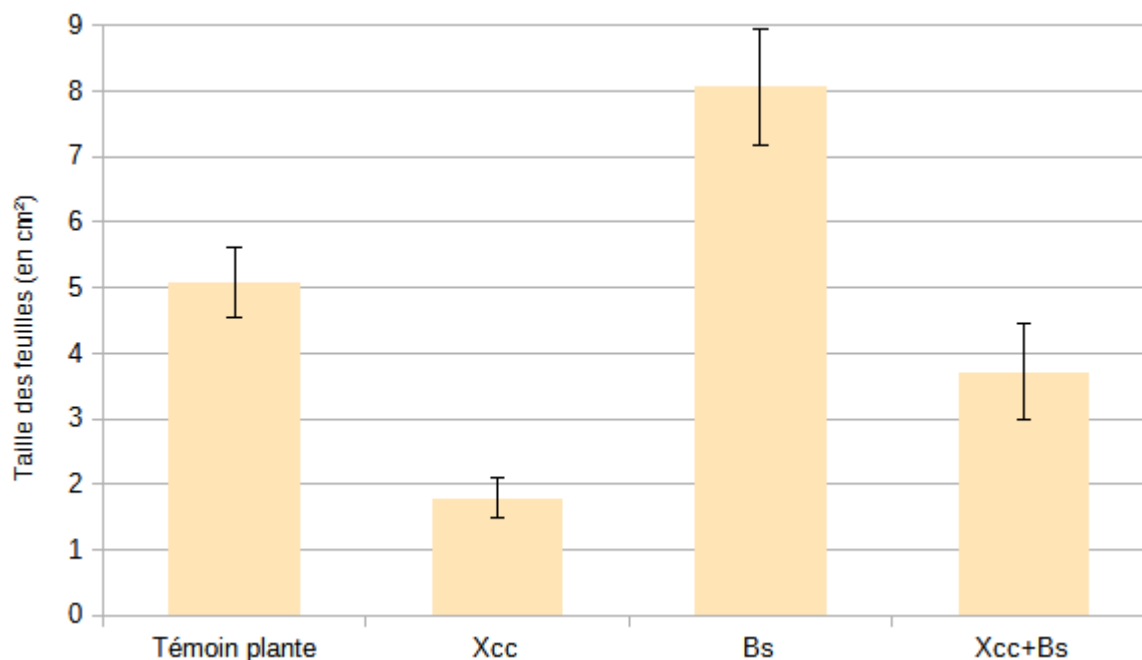
Un nombre non significativement différent de ramifications entre le témoin et *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* a été observé. De plus, aucune différence significative n'est observée entre *Bacillus subtilis* et *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*/*Bacillus subtilis*. Néanmoins, la différence entre le témoin et *Bacillus subtilis* est importante, cela confirme l'effet positif de *Bacillus subtilis* sur la ramification des plants de moutarde.

L'observation de la surface racinaire montre bien l'impact bénéfique de *Bacillus subtilis* et l'absence d'impact de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* sur la taille et le nombre de ramifications des plants de moutarde.

4) Résultats concernant la surface foliaire

Ces mesures ont été réalisées à partir de photographie de 5 feuilles de différents plants par bacs. La photographie a été importée dans le site Mesurim2 afin de mesurer leur surface.

Figure 6: Effets de *Bacillus subtilis* et *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* sur la surface des feuilles



Les résultats obtenus montrent des différences significatives entre tous les groupes. Les plants infectés par *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* présentent la plus faible surface foliaire, avec une moyenne de 1,79 cm², confirmant l'effet néfaste de cette bactérie sur le développement de la plante.

Pour le groupe infecté par les deux bactéries, la surface foliaire moyenne (3,73 cm²) est significativement différente à l'infection causée par *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. Cela démontre bien l'inhibition de *Bacillus subtilis* sur l'infection de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. Or la surface foliaire moyenne de ce groupe est inférieure à celle du groupe témoin, démontrant bien l'effet néfaste de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* malgré la présence de *Bacillus subtilis*.

Les plants traités avec *Bacillus subtilis* présentent une surface foliaire moyenne de 8,20 cm², supérieure à celle du groupe témoin (4,80 cm²). Cela nous confirme de nouveau l'effet bénéfique de *Bacillus subtilis* sur la croissance générale de la plante.

Ces résultats permettent de tirer plusieurs conclusions. D'une part, *Bacillus subtilis* semble avoir un effet bénéfique sur la croissance de la moutarde blanche lorsque la bactérie est utilisée seule. D'autre part, son efficacité en tant qu'agent de lutte biologique contre *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* a été démontrée dans cette expérience.

En conclusion, ces manipulations et ce cheminement de l'hypothèse à l'analyse des résultats de l'expérience in vitro à permis de mettre en évidence l'inhibition de *Bacillus subtilis* sur *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* grâce aux cercles d'inhibitions présents sur les géloses. En revanche, les résultats de l'expérience in vivo ont présenté une inhibition moins importante. Cela peut s'expliquer par les différences de conditions de culture des bactéries : température, humidité, exposition au soleil, exposition à l'air,.....

De plus, l'effet positif de *Bacillus subtilis* sur les plantes a été observé lors de l'expérience in vivo. Des expériences complémentaires, avec des conditions mieux maîtrisées et des concentrations ajustées, seront nécessaires pour confirmer ou infirmer cette hypothèse.

Bibliographie :

1. Auteur non identifié, (08/12/2017). Xanthomonas campestris pv. campestris, nervation noire des crucifères. Inrae, hébergé par Ephytia.
<https://ephytia.inra.fr/fr/C/25301/Vigi-Semences-Xanthomonas-campestris-pv-campestris-Nervation-noire-des-cruciferes>
2. Khosro I, et al.(23 February, 2012). Antagonism of Bacillus species against Xanthomonas campestris pv. campestris and Pectobacterium carotovorum subsp. Carotovorum. African Journal of Microbiology Research Vol. 6(7), pp. 1615-1620.
https://www.google.com/url?sa=t&source=web&rct=j&opi=89978449&url=https://academicjournals.org/article/article1380292467_Issazadeh%2520et%2520al.pdf&ved=2ahUKEwj_4dSX8fKRAxWrUKQEHe_tDmUQFnoECC8QAQ&usg=AOvVaw0sdlyQFh103qlhepbx-_Fz
3. DINESH SINGH¹, SHRI DHAR² and D.K. YADAV (29 août 2009). Effect of endophytic bacterial antagonists against black rot disease of cauliflower caused by Xanthomonas campestris pv. campestris.Hébergé par research gate.
https://www.researchgate.net/profile/Dhananjay-Yadav-2/publication/326569734_Effect_of_endophytic_bacterial_antagonists_against_black_rot_disease_of_cauliflower_caused_by_Xanthomonas_campestris_pv_campestris/links/5b568d22a6fdcc8dae3fce04/Effect-of-endophytic-bacterial-antagonists-against-black-rot-disease-of-cauliflower-caused-by-Xanthomonas-campestris-pv-campestris.pdf?origin=publication_detail&tp=eyJjb250ZXh0Ijp7ImZpcnN0UGFnZSI6InB1YmxpY2F0aW9uIiwicGFnZSI6InB1YmxpY2F0aW9uRG93bm9vcmVkaWwJsaWNhdGlviJ9fQ
4. Auteur non identifié, et al. 08/12/2017. Xanthomonas campestris pv. campestris. Hébergé par Ephytia.
<https://ephytia.inrae.fr/fr/C/25301/Vigi-Semences-Xanthomonas-campestris-pv-campestris-Nervation-noire-des-cruciferes>

Annexe

Pour calculer les concentrations de chacune des expériences réalisées, une expérience a été mise en place. Un comptage de cellules a été effectué sur une cellule de Tomas, en même temps une mesure d'atténuation a été réalisée. Suite à ces expériences, des calculs ont été effectués. Les calculs sont les suivants :

Pour *Bacillus subtilis* : $D^{600nm} = 1,0 \longleftrightarrow 2,0 \cdot 10^7$ cellules/mL

Pour *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* : $D^{600nm} = 1,0 \leftrightarrow 9,5.10^7$ cellules/mL

Pour chaque expérience réalisée, ces calculs ont été repris, en remplaçant les valeurs d'atténuances obtenues à chaque expérience, en faisant simplement un produit en croix.