

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 8 ماي 1945 قالمة
Université 8 Mai 1945 Guelma
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Sciences de la terre et de l'Univers



Mémoire En Vue de l'Obtention du Diplôme de Master

Domaine : Science de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité/Option : Santé, Eau et Environnement / Microbiologie de l'environnement.

Département : Ecologie et de génie de l'environnement

**Thème : Évaluation et taxonomie numérique des bactéries promotrices des
plantes isolées de rhizosphère du *Capsicum annuum***

Présenté par :

Benhacene Zahra

Messiad Iman

Slimane Bouhrem Loubna

Devant le jury composé de :

Président : Mme Bedioui S.

M.A.A. Université de Guelma

Examineur : Mme Boussadia M.I.

M.A.A. Université de Guelma

Encadreur : M^{lle} Khenaka K.

M.A.A. Université de Guelma

Juin 2016

Remerciement

Nous tenons à remercier Dieu qui nous a donné le courage et le savoir afin d'achever ce modeste travail.

Tous nos remerciements vont d'abord à Madame Bedioui S. (M.A.A à l'université de Guelma) d'avoir fait l'honneur d'accepter de présider ce jury.

Nos chaleureux remerciements s'adressent à Mme Boussaadia M.I. (M.A.A à l'université de Guelma) d'avoir eu l'amabilité d'accepter volontairement et aimablement d'examiner ce travail. Nous sommes particulièrement reconnaissantes et honorée par sa participation au jury de ce travail.

Nous remercions d'une façon toute particulière notre encadreur Mlle Khenaka. K (Maître assistant à l'Université 8 Mai 1945 de Guelma) pour avoir accepté de diriger ce travail, pour tous ses efforts, son savoir, ses critiques constructives et sa confiance.

Nos chaleureux remerciements à Mme Amri (maître assistant à l'Université 8 Mai 1945 de Guelma) qui a suivi ce travail. Toujours disponible, ses critiques objectifs et suggestions ont été d'un grand apport dans ce travail.

Enfin, nous tenons à remercier tous nos enseignants qui ont assuré notre formation et tout le personnel de la faculté des sciences de la nature et de la vie et sciences de la terre et de l'univers de l'université de 8 Mai 1945 de Guelma.

Table de matières

Liste des figures
Liste des tableaux
Liste des abréviations

Introduction 1

Chapitre 01 : La rhizosphère

1. Définition de la rhizosphère	3
2. La rhizodéposition et rhizodépôts	4
3. Rôle de la rhizosphère	5
4. Facteurs déterminants la richesse et l'activité de la rhizosphère	6
5. La faune et la flore de la rhizosphère	6
5.1. La faune de la rhizosphère	7
5.1.1. Sa composition	7
5.1.2. Son rôle	7
5.2. La flore de la rhizosphère	8
5.2.1. Composition et classement	8
5.2.1.1. Les algues	8
5.2.1.2. Les champignons	8
5.2.1.3. Les actinomycètes	8
5.2.1.4. Les bactéries	9
5.2.1.5. Les protozoaires	9
5.2.1.6. La flore de décomposition	9
5.2.1.7. La flore de minéralisation	9
5.2.1.8. Les bactéries fixatrices d'azote atmosphérique.....	9
6. Les facteurs favorisant la flore de la rhizosphère	10
7. Les différentes interactions microbiennes dans la rhizosphère	10
7.1. Symbiose	11
7.2. Compétition.....	11
7.3. Parasitisme	11
7.4. Commensalisme	12
7.5. Antagonisme	12

Chapitre 02 : Les rhizobactéries

1. Définition	13
2. Les différents types des PGPR	14
2.1. Les actinomycètes	14
2.1.1. Définition	14
2.1.2. Les propriétés générales des actinomycètes	14
2.1.2.1. Morphologie	14
2.1.2.1.1. Caractères macromorphologiques	14
2.1.2.1.2. Caractères micromorphologiques	15
2.1.2.2. Physiologie	15
2.1.2.3. Habitats et écologies	16
2.1.2.4. Importances des actinomycètes	16
2.2. Le genre <i>Pseudomonas sp</i>	17
2.2.1. Classification et habitat	17
2.2.2. Structure et morphologie	18
2.2.3. Croissance et nutrition	18
2.2.4. Induction de la défense des plantes par les bactéries du genre <i>Pseudomonas</i> <i>sp</i>	19
2.3. Le genre <i>Rhizobium sp</i>	19
2.3.1. Classification	20
2.3.2. Morphologie et physiologie	20
2.3.3. Habitat	20
2.4. Le genre <i>Bacillus sp</i>	21
2.4.1. Les propriétés générales	21
2.4.2. Habitat	22
2.4.3. Classification	22
2.5. Le genre <i>Azotobacter sp</i>	22
2.5.1. Habitat	23
3. Effets bénéfiques des rizophobactéries	24
3.1. La solubilisation du phosphate	24
3.2. La production des sidérophores	25

3.3. Fixation d'azote	27
3.4. La production des phytohormones	27
3.4.1. Les auxines	28
3.4.2. Les gibbérellines	28
3.4.3. La réduction de la production de l'éthylène	29
3.4.4. La production des cytokinines	29
3.4.5. L'acide abscissiques	29
3.5. Lutte biologique	30
3.5.1. Composés volatiles	30

Chapitre 03 : Taxonomie numérique

1. La taxonomie	31
1.1. La taxonomie numérique	31

Matériel et méthodes

1. Les souches étudiées	35
2. Les milieux de culture	35
3. Culture bactérienne et purification des souches	35
4. Tests préliminaires et morphologiques	35
4.1. Coloration de Gram	36
4.2. Mobilité	36
4.3. Catalase	36
4.4. Oxydase	37
5. Tests physiologiques et chimiques	37
5.1. Utilisation des sources de carbone	37
5.2. Utilisation des sources d'azote	37
5.3. La résistance aux antibiotiques	38
5.4. Les activités de dégradation	38
5.5. La croissance en présence d'inhibiteur chimique	39
5.6. La galerie classique	40
5.7. La galerie Api20NE	41
6. Taxonomie numérique	42

Résultats et discussion

1. Tests morphologiques et préliminaires	43
2. Tests physiologiques et biochimiques	44
2.1. Utilisation de sources de carbone.....	44
2.2. Utilisation des sources d'azote.....	45
2.3. La résistance des bactéries aux antibiotiques	47
2.4. Les activités de dégradation	48
2.5. La croissance en présence d'inhibiteurs chimiques et physiques	50
2.6. Identification phénotypique de quelques souches	54
2.7. Analyse phylogénétique	57

Conclusion

Références bibliographiques

Annexes

Résumés

Abstract

ملخص

Liste des figures

Figure 01 : Représentation schématique de la rhizosphère	4
Figure 02 : Présentation schématique des organismes du sol.....	7
Figure 03 : Observation par microscope électronique d'une souche de <i>Pseudomonas sp</i>	18
Figure 04 : Observation par microscope électronique d'une souche de <i>Rhizobium sp</i>	19
Figure 05 : Observation par microscope électronique d'une souche de <i>Bacillus sp</i>	22
Figure 06 : Observation par microscope électronique d'une souche d' <i>Azotobacter sp</i>	23
Figure 07 : Interactions entre plantes et les bactéries coopératives (PGPR) dans la rhizosphère	24
Figure 08 : Mécanismes de l'amélioration de la croissance des plantes par des bactéries solubilisant le phosphate	25
Figure 09 : Les fonctions biologiques des sidérophores.....	27
Figure 10 : Observation microscopique de la coloration de Gram (×100).....	43
Figure 11 : Photographies de l'utilisation des sucres de carbone.....	44
Figure 12 : Photographie de l'utilisation de source d'azote	46
Figure 13 : Photographies de la sensibilité et de la résistance des souches aux antibiotiques.	47
Figure 14 : Photographies des activités de dégradation.....	49
Figure 15 : Effet du pH sur l'inhibition de la croissance de certaines souches.	51
Figure 16 : Effet de différentes concentrations du NaCl sur la croissance de certaines souches	52
Figure 17 : photographie de la croissance de certaines souches en présence d'inhibiteurs chimiques.....	52
Figure 18 : Photographie de la résistance des souches aux pesticides.....	54
Figure 19 : Photographie de différents tests de la galerie	57
Figure 20 : Dendrogramme de la taxonomie numérique des bactéries à Gram négatif construit selon la méthode UPGMA	59

Figure 21: Dendrogramme de la taxonomie numérique des bactéries à Gram négatif construit selon la méthode NJ.	59
Figure 22: Dendrogramme de la taxonomie numérique des bactéries à Gram positif construit selon la méthode UPGMA.	61
Figure 23: Dendrogramme de la taxonomie numérique des bactéries à Gram positif construit selon la méthode NJ.	61

Liste des tableaux

Tableau 01: Les différentes catégories de rhizodépôts selon leur composition biochimique et leur mode de libération.....	1
Tableau 02: Répartition des quelques genres d'actinomycètes par types d'habitat.....	16
Tableau 03: classification de genre <i>Bacillus sp</i>	22
Tableau 04: Codage des états des caractères.....	42
Tableau 05: Morphologique et tests préliminaires pour l'identification des souches.....	43
Tableau 06: L'utilisation des sources de carbone	45
Tableau 07: L'utilisation des sources d'azote.....	46
Tableau 08: La résistance des bactéries (PGPR) aux antibiotiques	48
Tableau 09: Les activités de dégradation des bactéries (PGPR)	50
Tableau 10: La croissance en présence d'inhibiteur chimique et physique	51
Tableau 11: La résistance des bactéries (PGPR) aux pesticides.....	53
Tableau 12: Identification phénotypique de quelques souches à Gram négatif par galerie Api20NE.....	55
Tableau 13: Caractéristiques métaboliques des souches d'après les tests de la galerie classique.....	56
Tableau 14: Matrice de distance des bactéries à Gram négatif	58
Tableau 15: Matrice de distance des souches à Gram positif.....	60
Logigramme 1: La démarche de la taxonomie numérique.....	32

Liste des abréviations

ACC : 1-aminocyclopropane-1-carboxylate.

AIA : Acide Indole-3-acétique.

API20NE : Appareillage et procédés d'identification des Non Entérobactéries (galerie biochimique).

ATB: Antibiotique.

CMC: Carboxy methyl cellulose.

GN: Gélose nutritif.

GB: Gibbérelline.

HCN : Acide Cyanhydrique.

IJSEM : *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*.

ISR : Résistance Systématique Induite.

KNO3 : Nitrate de potassium.

MA : Mycélium Aérien.

MH: Muller Hinton.

MM : Milieu minimum.

MS: Mycélium du Substrat.

N₂: Azote atmosphérique.

NaCl: Chlorure de sodium.

NJ: La méthode de Neighbor-Joining

OUT: Operational Taxonomic Units.

PHB: Poly- β -hydroxybutyrates

PGPB: Plant Growth Promoting Bacteria

PGPR: Plant Growth Promoting Rhizobacteria

P/V: Poids par Volume.

RFCP: Rhizobactéries Favorisant la Croissance des Plantes

Tilt : Propiconazol [[(Dichloro2, 4 phényl)-2 propyl-4 dioxolanne-1,3yl-2]-méthyl]-1 IH-triazole-1, 2,4 (2RS, 4RS) (2RS, 4SR).

Topic : clodinafop-propargyl [2-propynyl-(R)-2- [4-(5-chloro-3- fluoro-2-pyridinyloxy)-phenoxy]propionate]

TSI: Triple sugar iron.

UPGMA: unweighted pair group method with arithmetic mean

YMA: Yeast Mannitol Agar.

Introduction

Introduction

Le sol est un environnement complexe caractérisé par une grande diversité d'organismes (notamment les microorganismes), de composés chimiques, et par une structure physique complexe [1].

La rhizosphère, ce terme qui désigne la zone du sol dans laquelle la microflore tellurique est soumise aux influences des racines [2]. C'est une zone d'intense activité microbiologique en raison des exsudats racinaires des plantes, ces activités bénéfiques peuvent être directes par le biais des relations symbiose avec les plantes, ou indirectes via l'action des microorganismes vivant librement dans la rhizosphère qui modifient les taux d'approvisionnement en éléments nutritifs et la répartition des ressources [3].

Par ailleurs, la croissance des plantes ne repose pas uniquement sur la disponibilité et l'absorption des nutriments. Certains mécanismes de croissance sont contrôlés par des substances autres que les nutriments. Ces substances sont produites par des micro-organismes mieux connus sous leur vocable anglais « Plant Growth Promoting Bacteria » (PGPB) [4]. Ces rhizobactéries bénéfiques sont connues par leur aptitude à réduire l'incidence des maladies racinaires par l'inhibition de la croissance d'un grand nombre d'agents phytopathogènes, de plus, elles peuvent produire des phytohormones telles que les auxines et la synthèse de métabolites particuliers (sidérophores, enzymes...etc.) [5].

L'isolement des bactéries promotrices de croissance de plante est réalisé à partir du sol adhérent aux racines ou à partir des racines elles mêmes. La sélection de ces bactéries est faite à travers différents tests de mise en évidence de la production des métabolites d'intérêts tels que les auxines, les sidérophores, la solubilisation de phosphate, l'inhibition des phytopathogènes, ...etc. Cependant, l'application de ces bactéries nécessite de définir leurs caractéristiques phénotypiques (caractères morphologiques, caractères métaboliques,...).

Compte tenu de l'importance des caractéristiques phénotypiques, nous sommes fixées l'objectif de ce travail. Les souches utilisées dans cette étude sont des bactéries isolées de la rhizosphère de *Capsicum annuum* de la région de Guelma, et qui sont connues (étudiées précédemment) par leurs aptitudes de produire des auxines, des sidérophores et à solubiliser le phosphate inorganique. Les étapes de réalisation de ce travail sont les suivants :

- ✓ Une étude morphologique des souches.

Introduction

- ✓ Etude des conditions physiologiques et biochimiques pour la croissance des bactéries, tels que la croissance à différents pH, la tolérance de la salinité et les pesticides et l'utilisation des différentes sources de carbone et d'azote.
- ✓ Détermination phénotypique de quelques souches par l'application du système de la galerie Api 20NE.
- ✓ A la fin, les résultats obtenus sont utilisés pour étudier la ressemblance entre les souches du point de vue phénotypique à travers l'élaboration d'une matrice binaire et un arbre en utilisant deux algorithmes UPGMA et NJ.

1. Définition de la rhizosphère

Le concept de rhizosphère a été développé par le microbiologiste visionnaire Hiltner qui perçut dès 1904 [6]. « rhizo » vient du grec « *rhiza* » signifiant racine, « sphère » vient du latin « *sphaera* » signifiant balle, ballon ou globe. La sphère définit le champ d'influence du système racinaire [7].

Le terme rhizosphère désigne la mince couche du sol qui entoure les racines absorbantes et dont la composition est profondément modifiée par l'activité et le métabolisme de la racine. Elle diffère de la masse du sol par son pH, son potentiel d'oxydoréduction, par l'abondance et la composition de la matière organique et enfin par sa forte activité biologique qui se traduit par une teneur élevée en CO₂. Ainsi, malgré le petit volume qu'occupe la rhizosphère dans le sol, elle joue un rôle central dans le maintien du système sol-plante [8].

Le volume de la rhizosphère est variable selon le développement racinaire : il représente entre 0,1 et 1% du sol global des écosystèmes forestiers et près de 100% des premiers centimètres des sols prairiaux.

Cette zone d'interaction peut être divisée en trois zones distinctes (**Figure 01**) : l'endorhizosphère (intérieur de la racine), le rhizoplan (surface racinaire) et l'ectorhizosphère ou le sol rhizosphérique (sol lié à la racine par opposition au sol distant) [9].

❖ L'endorhizosphère

Certaines bactéries vivent au contact direct de la racine, voire même pénètrent dans les tissus rhizodermiques et corticaux, sans pour autant être parasites ou prédatrices. Ceci souligne le fait que l'interface entre la racine et la microflore s'étend à l'intérieur de la racine [9].

❖ Le rhizoplan

Le rhizoplan (RP), selon clarck [9] désigne la surface racinaire et les bactéries qui y sont fortement adhérentes.

Chapitre 01 : la rhizosphère

Tableau 01: Les différentes catégories de rhizodépôts selon leur composition biochimique et leur mode de libération [12].

Types de rhizodépôts	
Les exsudats	Composés hydrosolubles de faible poids moléculaire, libérés passivement par les racines vers la solution du sol selon un gradient de concentration. Représentés principalement par des sucres (glucose, fructose, maltose ...) des acides aminés, carboxyliques et phénoliques et en moins grande proportion par des vitamines, des régulateurs de croissance, des enzymes et des nucléotides.
Les sécrétions	Composés de poids moléculaire variable, libérés par transport actif. Ce sont notamment des glucides.
Les mucilages	Composés de poids moléculaire élevé. Libérés principalement au niveau des apex voire même des poils absorbants. Représentés par des sucres polymérisés et des protéines.
Le mucigel	Mélange complexe de mucilage, de débris racinaires, bactériens et de particules minérales.

3. Rôle de la rhizosphère

En effet, il existe une double relation fonctionnelle qui est établit dans la rhizosphère, ces relations concernent l'effet des racines sur le milieu environnant, ainsi que la réponse de la microflore à l'activité racinaire.

Le rôle de la rhizosphère peut être résumé dans les points suivants :

- La rhizosphère joue un rôle essentiel dans les processus de phytoremédiation [13].
- La rhizosphère rendue compte de la stimulation de la croissance et de l'activité des communautés microbiennes autour des racines [14].
- La rhizosphère est le siège de processus physiques et chimiques spécifiques liés à l'alimentation hydrique et minérale des plantes [15].
- La rhizosphère est apparue comme le lieu privilégié des échanges de matière et d'énergie : la libération de composés organique, l'absorption d'eau et d'ions, la synthèse des métabolites microbien divers et variés [16].

Chapitre 01 : la rhizosphère

- La rhizosphère est une région du sol riche en gaz carbonique et pauvre en oxygène dissous, la rhizosphère est de ce fait un site réducteur, où se développe une activité dénitrifiante, réduisant l'ion nitrate en oxyde d'azote, voire en ammoniac [15].
- Elle contribue à modifier les propriétés des sols : propriétés biologiques, biodiversités et activités microbiennes, fertilité et qualité du sol [15].
- Dans la rhizosphère la synthèse de phosphatase mène à une augmentation de la disponibilité du phosphore, et en contre partie son assimilation par les plantes [17].
- La rhizosphère est une niche écologique qui éveille et stimule diverses activités microbiennes en participant ainsi, au fonctionnement des cycles des nutriments majeurs et des oligoéléments comme le carbone, l'azote, phosphore, le fer...etc [15].
- La rhizosphère joue un rôle singulier dans la régulation de la santé et de la nutrition des plantes, en lien avec la nature des exsudats racinaires [17].

4. Facteurs déterminant la richesse et l'activité de la rhizosphère

D'une façon générale, l'activité microbienne dans la rhizosphère est régie :

- Par des facteurs de l'environnement climatique, notamment : l'humidité de l'air, température, radiation solaire, teneur en CO₂.
- Par des facteurs de l'environnement édaphique, notamment : teneur du sol en eau et en oxygène, température du sol, teneur du sol en éléments assimilables par les plantes, présence de composés phytotoxiques.
- Par des échanges de « molécules signal entre les racines des plantes et les microorganismes qui leur sont associés » (champignons, bactéries, cyanobactéries...). Mais quand il y a par exemple une symbiose associative entre les PGPR et une plante, le rôle et l'importance de ces molécules est encore mal connu. Les signaux rhizosphériques influent sur l'expression génique « épigénétique ». Ils sont souvent « phytobénéfiques » en améliorant par exemple l'architecture, la croissance et le fonctionnement du système racinaire [15].

5. La faune et la flore de la rhizosphère

La population de la rhizosphère représentée dans la (**Figure 02**) est :

Chapitre 01 : la rhizosphère

- ❖ nombreuse: bien que très variable d'un sol à l'autre, le poids de matière vivante à l'hectare est environ de 2,5 tonnes.
- ❖ variée: il y a une grande diversité d'espèces, de tailles et de modes de nutrition.
- ❖ en équilibre: vivant en communauté, ces êtres vivants sont tantôt en concurrence, tantôt en association et sont très sensibles aux conditions du milieu [18].

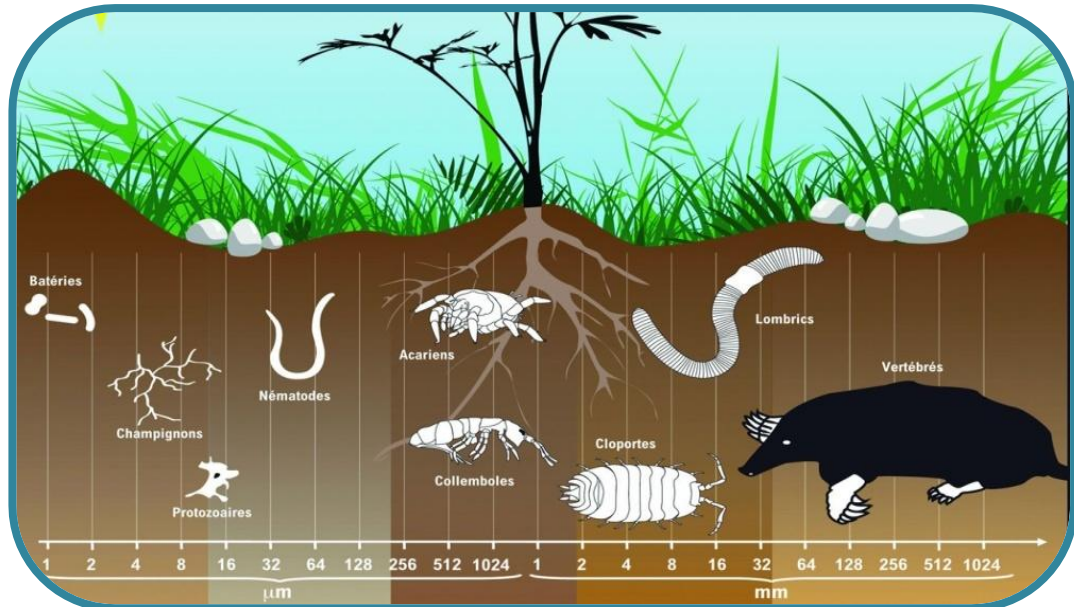


Figure 02 : présentation schématique des organismes du sol [19].

5.1. La faune de la rhizosphère

5.1.1. Sa composition

La faune de la rhizosphère peut être classée en deux sous-groupes :

- La macro-faune :** elle est constituée par des animaux mesurant plus de 2 mm.
 - mammifère, rongeur et insectivore.
 - vers de terre.
 - arthropodes (insectes, arachnides et myriapodes).
 - mollusques (escargots, limaces) [18].
- La micro-faune :** elle est constituée par des animaux mesurant moins de 2 mm.
 - nématodes.
 - rotifères et tardigrades.
 - protozoaire [18].

5.1.2. Son rôle

Le rôle de la faune dans la rhizosphère est triple :

a). Une action sur l'état physique de la rhizosphère

- création de galeries, aération, drainage.
- fragmentation de la matière organique.
- brassage énergétique de ces fragments.
- malaxage et transport des matières organiques dans tout le profil du sol.
- formation d'agrégats stables et amélioration de la porosité, donc de la structure et de la stabilité structurale du sol (par le biais de la fabrication d'humus) [18].

b). Une action chimique

- lutte contre le lessivage en remontant les éléments minéraux lessivés hors d'atteinte des racines, et enrichissement en minéraux assimilables. Leurs déjections sont considérablement plus riches en potassium, phosphore et magnésium assimilables.
- amélioration de l'assimilabilité des éléments minéraux grâce à cette prédigestion notamment par les vers de terre.
- mobilisation sous forme organique d'une partie des éléments minéraux présents dans le sol [18].

c). Une action biologique

- stimulation de la flore microbienne de la rhizosphère avec une sélection et un rajeunissement permanents des souches les mieux adaptées.
- limitation d'invasions extérieures par des parasites [18].

5.2. La flore de la rhizosphère

5.2.1. Composition et classement

On retrouve dans cette flore :

Chapitre 01 : la rhizosphère

5.2.1.1. Les algues : leur chlorophylle les rend autotrophes. Elles vivent dans les deux premiers centimètres du sol. Certaines algues hétérotrophes peuvent vivre plus profondément [18].

5.2.1.2. Les champignons: ce sont des êtres hétérotrophes. Les champignons vivent là où ils peuvent absorber de la matière organique, des minéraux et de l'eau. Ils poussent souvent sur des restes de plantes ou d'animaux, soit 1000 à 1500 kg/ha [18].

5.2.1.3. Les actinomycètes: ce sont des êtres unicellulaires, ramifiés comme les moisissures, filamenteuses, et qui participent principalement dans la protection des plantes contre les différents agresseurs [18].

5.2.1.4. Les bactéries: on trouve de quelques kg à plusieurs tonnes à l'hectare.

On peut les classer en fonction de leur milieu de vie :

- ❖ aérobies: ont besoin d'air pour vivre.
- ❖ anaérobies: vivent sans air [18].

5.2.1.5. Les protozoaires : protozoaire signifie premier animal. Un organisme eucaryote, unicellulaires et hétérotrophes. Ils sont d'autant plus nombreux que les sols sont humides et riches en matières organiques, soit 1 à 2 millions par gramme de terre. Le protozoaire obtiendra d'habitude de leur nutrition en engloutissant des particules alimentaires et des petites particules nutritives, comme des bactéries, des algues ou même d'autre protozoaire. Ils jouent un rôle régulateur sur les populations bactériennes qu'ils broutent, ils recyclent rapidement une biomasse importante qui est mise à disposition de la communauté biologique [20].

5.2.1.6. La flore de décomposition : les champignons, les actinomycètes et les bactéries saprophytes constituent ce que l'on appelle la microflore de décomposition. Elle prolifère près de toute matière organique morte (cadavres d'animaux, débris végétales) enfouie dans le sol frais et la décompose pour produire, par une série de réactions chimiques complexes, de l'humus [21].

Chapitre 01 : la rhizosphère

5.2.1.7. La flore de minéralisation : elle est présente dans la rhizosphère, c'est-à-dire à la surface des radicelles des plantes en croissance ou en germination. Ces dernières ont besoin d'ions nitrate NO_3^- pour se développer. La flore de minéralisation en fournit par la transformation lente de l'humus [22].

5.2.1.8. Les bactéries fixatrices d'azote atmosphérique : certaines bactéries ont la capacité de transformer l'azote atmosphérique (inutilisable pour les plantes) en ions ammonium ou en nitrates. Les bactéries du genre *Rhizobium* ne peuvent effectuer cette transformation qu'associées à une plante de la famille des légumineuses. Elles pénètrent dans sa racine et la plante réagit en produisant une excroissance de tissus plus ou moins sphérique : ce sont les nodosités renfermant les bactéries. Leur activité permettra de transformer l'azote en ions ammonium ou (et) nitrate assimilables par les végétaux.

Certaines bactéries appartenant aux genres *Azotobacter*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Enterobacter* peuvent, quant à elles, fixer N_2 de façon autonome (sans dépendre de l'association avec une plante) [22].

6. Les facteurs favorisant la flore de la rhizosphère

- ❖ L'aération: la plupart des micro-organismes utiles ont besoin d'air, donc ils sont aérobies [18].
- ❖ L'humidité : (même niveau pour les racines que pour les micro-organismes) Elle doit être en moyenne de 18 à 20 % [18].
- ❖ La température:
 - activité nulle à 0°C.
 - moyenne à 10 - 15°C.
 - optimale à 30°C [19].
- ❖ Le pH (optimum de 6 à 7.5) : voisin de la neutralité. Si trop acide : destruction de la flore [18].
- ❖ La présence de calcium échangeable (pour neutraliser les acides organiques formés lors de l'activité microbienne) [18].
- ❖ La quantité de matières organiques: un apport stimule la flore du sol mais une quantité élevée peut-être un signe de mauvaise décomposition [18].
- ❖ La présence de la faune [18].

- ❖ Enfin, le mode d'exploitation peut plus ou moins favoriser l'activité de la flore et de la faune du sol [18].

7. Les différentes interactions microbiennes dans la rhizosphère

Au niveau de la rhizosphère qui est une zone riche en matière organique et où les populations microbiennes sont très abondantes. Les interactions entre les microorganismes sont nombreuses et très intenses, ces interactions sont catalysées par les exsudats racinaires qui favorisent certains groupes de microorganismes au dépend d'autres au sein de la communauté microbienne. Les interactions sont les suivantes [23] :

7.1. Symbiose

Plus que d'autre processus, le fonctionnement de symbiose repose sur l'interaction étroite entre les trois composantes qui sont le sol, les microorganismes du sol et la plante. Le sol détermine les conditions physico-chimiques, dont certaines sont indispensables à l'établissement de la symbiose.

La symbiose entre bactéries de la famille des *Rhizobiacées* (*Rhizobium*, *Fradyrhizobium*, *Azorhizobium*) et les plantes de la famille des Fabacées, anciennement famille des légumineuses, est la plus connue et la plus étudié. Cette association forme des nodosités sur des racines. Certaines bactéries du genre *Rhizobium* ont la propriété de fixer N₂. La plante fournit le site, sous forme de la nodosité, et le couvert, sous forme de sucre et d'acides aminés. En fixant l'azote, la bactérie fournit à la plante un nutriment qui favorise sa croissance dans la plupart des sols non cultivés.

La symbiose *Rhizobia*-légumineuse a été utilisée dans les systèmes de rotation de cultures pour augmenter la fertilité du sol bien avant l'identification des *Rhizobia* par Hellriegel et Wilfarth en 1888 [15].

7.2. Compétition

La compétition entre deux ou plusieurs microorganismes concerne soit les éléments nutritifs, l'espace ou les autres facteurs environnementaux qui deviennent limitatifs pour la croissance. L'effet sélectif des exsudats racinaires sur la microflore serait le résultat de la

Chapitre 01 : la rhizosphère

compétition qui oppose des souches à croissance lente et des souches à croissance rapide, ces dernières sont particulièrement favorisées dans la rhizosphère [17]. La fréquence élevée des *Fusarium* dans la rhizosphère serait due au pouvoir compétitif de ce champignon [24].

7.3. Parasitisme

Est l'attaque directe d'un microorganisme par un autre dans un but nutritionnel, dont un des protagonistes (le parasite) tire profit (en se nourrissant, en s'abritant ou en se reproduisant) aux dépens d'un hôte. La rhizosphère qui héberge une large variété de populations microbiennes, constitue un milieu favorable pour l'apparition du parasitisme [25].

7.4. Commensalisme

Définit une interaction bénéfique pour l'un des partenaires et qui n'est ni avantageuse ni défavorable pour le second [26].

7.5. Antagonisme

En écologie, le terme d'antagonisme désigne une inhibition ou une action défavorable d'un organisme vis-à-vis d'un autre à l'intérieur d'une population microbienne mixte. L'antagonisme se manifeste généralement soit par une compétition, un hyperparasitisme, une production de sidérophores ou par une antibiose [27].

1. Définition

Les rhizobactéries sont des bactéries qui ont le pouvoir de coloniser la rhizosphère. L'impact des rhizobactéries sur la croissance des plantes peut être bénéfique, neutre ou délétère. Durant les dernières années, l'étude de la biologie de la rhizosphère a mis en évidence un groupe spécial de micro-organismes bénéfiques qui colonisent les racines des plantes, stimulent leur croissance et les protègent contre certains pathogènes. On désigne ces bactéries par le terme rhizobactéries favorisant la croissance des plantes ou RFCP. Elles représentent environ 5% des bactéries vivant dans la rhizosphère. Les RFCP sont généralement des bactéries à Gram négatif. Elles appartiennent à plusieurs groupes taxonomiques: *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Rhizobium*,... [28].

On distingue deux grands groupes de PGPR : les phytostimulatrices et les phytoprotectrices.

- ❖ **Les PGPR phytostimulatrices** : elles influencent la croissance des plantes par :
 - améliorant la biodisponibilité de certains nutriments par la fixation de l'azote atmosphérique, ou par solubilisation du phosphate.
 - synthétisant des phytohormones comme des auxines, cytokinines, gibbérellines.
 - Modulant le développement des plantes, grâce à une activité 1-aminocyclopropane-1-carboxylate désaminase, qui va entraîner une elongation racinaire.
 - facilitant la mise en place ou le fonctionnement des symbioses mutualistes entre les racines et les bactéries fixatrices d'azote ou les champignons micorhiziens [29].

- ❖ **Les PGPR phytoprotectrices** : elles favorisent la croissance des plantes en réduisant le niveau de certaines maladies. Pour cela, elles peuvent agir :
 - Par antagonisme en produisant des antibiotiques délétères pour les pathogènes.
 - Par interférence avec des signaux, en détruisant les molécules signal des pathogènes.
 - En activant la résistance systémique induite de type ISR des plantes, qui augmentera la résistance des plantes à l'attaque des pathogènes.

- En contrôlant la croissance des pathogènes par la compétition pour les éléments nutritifs, comme par exemple, la compétition pour le carbone et la compétition pour le fer dont la biodisponibilité dans le sol est très faible [29].

2. Les différents types des PGPR

2.1. Les actinomycètes

2.1.1. Définition

Etymologiquement, le mot actinomycète a été dérivé des mots grecs « *aktis* : rayon » et « *mykes* : champignon ».

Les actinomycètes ont été considérés comme un groupe intermédiaire entre bactérie et champignon. Maintenant, ils sont reconnus comme des organismes procaryotes [30]. Un des premiers organismes étudiés dans ce groupe est le genre *Actinomyces* qui a donné son nom au groupe [31]. Les actinomycètes appartiennent à la classe des *Actinobacteria*, constituent l'ordre des *Actinomycétales* et regroupe les genres *Streptomyces*, *Frankia*, *Actinomyces* et *Nocardia* qui comprennent des bactéries filamenteuses dont la morphologie ressemble à première vue à celle des mycètes filamenteux: c'est pourquoi on les appelle de manière informelle actinomycète [32]. Possédant un coefficient de Chargaff (%GC) : généralement compris entre 60 et 75 %. Le phylum des *Actinobacteria* est grand et complexe. Il regroupe 5 ordres, 13 sous-ordres, 48 familles, et plus de 200 genres bactériens. Leur croissance est lente (de quelques jours à quelques semaines) avec un temps de génération de 2 à 3 heures [33].

2.1.2. Les propriétés générales des actinomycètes

2.1.2.1. Morphologie

2.1.2.1.1. Caractères macromorphologiques

Les caractères cultureux contribuent parfois dans la différenciation des genres d'actinomycètes entre eux. Parmi les caractères cultureux importants :

- La production d'un mycélium aérien (MA) ou non [34].
- La présence ou non de mycélium du substrat (MS) [34].
- La couleur du MA et du MS. La couleur exacte peut être définie à l'aide d'une charte de couleur [34].
- La production et la couleur des pigments diffusibles dans le milieu de culture [34].

2.1.2.1.2. Caractères micromorphologiques

Les critères micromorphologiques sont :

- La fragmentation ou non du MS.
- La formation de spores exogènes sur le MA et/ou sur la MS, leur forme, leur taille et leur agencement (isolées, en chaînes), la présence ou non de sporophores, la surface des spores (lisse, rugueuse, épineuse ou chevelue) [34].
- La présence ou non de sporanges sur le MA ou sur le MS, la forme et la taille des sporanges, le nombre de spores par sporange ainsi que la longueur des sporangiophores [34].
- La présence de spores mobiles (ex : *Planomonospora*, *Planobispora*, *Spirillospora*, *Actinoplanes*) ou non mobiles (ex : *Streptomyces*, *Streptosporangium*, *Micromonospora*, ainsi que de nombreux autres genres...) [34].
- La formation d'endospores (*Thermoactinomyces*) ou la présence de structures particulières comme les sporanges, les sclérotés ou synnemata (*Actinosynnema*) [34].
- Les colonies formées par les actinomycètes sur des milieux solides présentent différents aspects macroscopiques qui peuvent être regroupés en trois types :
 - ✓ des colonies poudreuses habituellement couvertes d'hyphes aériens fermement attachés au milieu.
 - ✓ des colonies pâteuses rugueuses ou lisses qui peuvent être facilement détachées des milieux solides.
 - ✓ des colonies exemptes de mycélium de substrat et se composent d'hyphes aériens attachés au milieu par des crampons [35].

2.1.2.2. Physiologie

Les actinomycètes sont des bactéries à coloration de Gram positive, généralement aérobies à métabolisme oxydatif, plus rarement anaérobies à métabolisme fermentatif. Organismes hétérotrophes [36]. En général, les actinomycètes sont des chimio-organotrophes utilisant une grande variété de source d'énergie y compris les polymères complexes. Mais plusieurs espèces sont aussi des chimio-autotrophes utilisant l'oxydation de l'hydrogène comme source d'énergie et le gaz carbonique comme source de carbone [37].

Chapitre 02 : Les Rhizobactéries.

Certains actinomycètes sont capables de se développer à des températures élevées et de produire des enzymes actives dans des conditions acides et croissent de façon optimale dans la gamme de pH 5,0 à 9,0 avec une proximité optimale à la neutralité [38].

2.1.2.3. Habitats et écologies

Les actinomycètes sont très largement distribués dans la nature et principalement dans les sols de différentes natures (**Tableau 02**). Ils ont été trouvés dans les eaux douces ou salées, dans les compostes végétaux, dans l'atmosphère et dans les substrats les plus divers. Dans le sol ils sont présents depuis la surface jusqu'à plus de 2m de profondeur ; et se retrouvent également dans les fumiers, au fond des lacs et des rivières, dans les produits alimentaires, où ils peuvent causer leur détérioration et dans l'air. La majorité des actinomycètes croient dans des conditions humides mais aérobies et peuvent se développer dans des endroits où l'activité est très basse [39].

Tableau 02 : Répartition des quelques genres d'actinomycètes par types d'habitat [40].

Genre	Habitat
<i>Actinomadura</i>	Sol.
<i>Actinoplanes</i>	Sol, eau, litière.
<i>Frankia</i>	Les nodules des racines.
<i>Microbiospora</i>	Sol.
<i>Micromonospora</i>	Sol, eau.
<i>Rhodococcus</i>	Sol, eau, fumier, litière, matière en décomposition.
<i>Saccharomonospora</i>	Sol, eau, litière.
<i>Streptomyces</i>	Sol et eau.
<i>Streptosporangium</i>	Matière en décomposition et en fermentation.

2.1.2.4. Importances des actinomycètes

- les actinomycètes sont les plus prolifiques de tous les microorganismes en tant que producteurs d'ATB.

Chapitre 02 : Les Rhizobactéries.

- les enzymes sont, après les ATB, les plus importants produits des actinomycètes. Certaines sont utilisées à cet effet dans l'industrie alimentaire (isomérase du glucose) et dans celle des détergents.
- les glycosidases des actinomycètes jouent un rôle important dans la dégradation des biomasses végétales (amylase) et animales (chitinases).
- Les actinomycètes sont importants en raison surtout de leur rôle dans la fertilisation des sols, synthèse de composés complexes comme les ATB, vitamine et les stéroïdes.
- Ils participent activement à l'humification en s'attaquant à la lignine, certains actinomycètes (*Frankia*) vivent en symbiose avec diverses espèces végétales comme l'aulne [41].

2.2. Le genre *Pseudomonas sp*

Le genre *Pseudomonas sp* est découvert en 1894, ce sont des bactéries ubiquistes particulièrement abondantes dans les sols, les eaux, et souvent pathogène des animaux et des végétaux. Les bactéries du genre *Pseudomonas sp* sont des bacilles à Gram négatif (**Figure 03**), rarement immobiles [42].

2.2.1. Classification et habitat

Le genre *Pseudomonas sp* appartient au phylum des *Proteobacteria*, à la classe des *Gammaproteobacteria*, à la famille des *Pseudomonadaceae*, et à l'ordre des *Pseudomonales*. Actuellement, nous comptons 188 espèces répertoriées dans « *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* » (IJSEM) comme: *P.aeruginosa*, *P. fluorescens* et *P. stutzeri* [43].

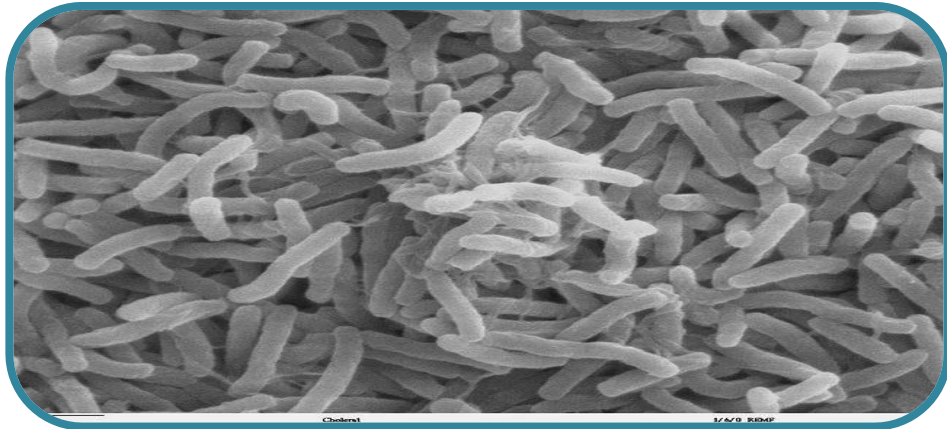


Figure 0 3 : Observation par microscope électronique d'une souche de *Pseudomonas sp* [44].

Les bactéries du genre *Pseudomonas sp* sont pour la plupart des ubiquitaires, nous les retrouvons sur tous les horizons particulièrement sur les systèmes racinaires des plantes. Ces microorganismes colonisent un large éventail d'environnements, elles sont rencontrées principalement dans les sols, sur les végétaux, ainsi que dans les eaux douces, marines et thermales. Elles se retrouvent en plus petite quantité dans les eaux riches en matière organique, elles se développent sur tous les milieux usuels, même les plus simples. Elles sont alcalinophiles [45].

2.2.2. Structure et morphologie

Les *Pseudomonas* sont des bacilles à Gram négatif, asporulantes, de forme droite ou légèrement courbée. Leur taille est comprise entre 0,5 à 1 μm de diamètre sur 1,5 à 5 μm de long, très mobiles en aérobiose grâce à une ciliature polaire monotriche, lophotriche ou multitriche [46]. Cependant, certaines souches et notamment *P. mallei* sont immobiles et aciliées. Elles possèdent plusieurs caractéristiques intrinsèques qui les rendent particulièrement intéressantes pour une utilisation comme agents de lutte biologique [47].

2.2.3. Croissance et nutrition

Les bactéries du genre *Pseudomonas sp* ont la capacité à croître à des températures extrêmes qui varient de 4°C à 42°C. Toutes les espèces ou souches saprophytes se multiplient à des températures optimales situées entre 28°C et 30°C [47].

2.2.4. Induction de la défense des plantes par les bactéries du genre *Pseudomonas* *sp*

Plusieurs rhizobactéries du genre *Pseudomonas* ont la capacité d'induire une résistance systémique chez la plante, ce qui engendre une protection contre un grand nombre d'agents pathogènes fongiques et bactériens. Parmi les facteurs déterminants l'induction de la résistance systémique par les *Pseudomonas*, on remarque les lipopolysaccharides, les sidérophores et l'acide salicylique. Les sidérophores, semblent être surtout importants dans des conditions limitantes en fer. Également, une souche productrice d'antibiotiques (*P. fluorescens*) s'est avérée capable d'induire une résistance systémique envers *Peronospora parasitica* chez *Arabidopsis thaliana* [48].

2.3. Le genre *Rhizobium* *sp*

Les *Rhizobia* du grec « *rhiza* » qui signifie racine et « *bio* : vie», *Rhizobium* signifie donc littéralement organisme vivant dans la racine. Ils sont des bactéries formant une symbiose fixatrice d'azote avec les légumineuses (**Figure 04**). Après colonisation du système racinaire par des *rhizobia* compatibles avec la plante hôte, il y a formation de nodules ou (nodosités), à l'intérieur desquelles les *Rhizobia* endosymbiotiques fixeront l'azote atmosphérique au bénéfice de la plante. Le développement des nodules sur les racines des plantes hôtes et l'infection des cellules végétales par les *Rhizobia* est appelé le processus de nodulation. Les *Rhizobia* sont importants pour l'agriculture puisqu'ils favorisent la croissance des légumineuses même en absence d'engrais azotés et contribuent ainsi à l'enrichissement des sols [49].

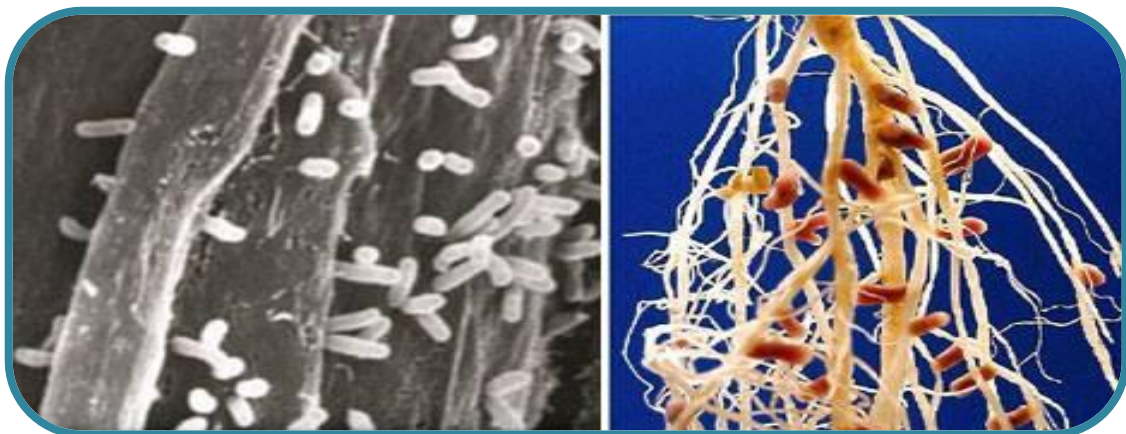


Figure 04 : Observation par microscope électronique d'une souche de *Rhizobium* *sp* [50].

2.3.1. Classification

Les bactéries du genre *Rhizobium sp* appartiennent à la famille des *Rhizobiaceae* comportant actuellement cinq (5) genres divisés en 22 espèces. Il s'agit notamment des genres *Rhizobium sp*, *Sinorhizobium sp*, *Azorhizobium sp*, *Bradyrhizobium sp* et le cinquième genre récemment découvert appelé *Mesorhizobium sp*. Le genre *Rhizobium* appartient à la classe des *Alphaprotéobactéries* et à l'ordre des *Rhizobiales* [51].

2.3.2. Morphologie et physiologie

Les cellules des bactéries du genre *Rhizobium sp* sont des bâtonnets de type pléomorphe sous des conditions de croissance adverse. Ce sont des organismes de petites tailles d'environ 0,5-0,9 μm de largeur et 1,2 à 3 μm de longueur. Leur paroi cellulaire est de type Gram négatif. Elles ne forment pas des spores. Elles sont mobiles grâce à un flagelle polaire ou 2-6 flagelles péritricheux. Le métabolisme respiratoire a l'oxygène comme accepteur final d'électrons (aérobie). La température optimale de croissance varie de 25 à 30°C et le pH optimal est près de la neutralité (6 à 7). Elles sont chimio-organotrophes et une grande gamme d'hydrates de carbone ou d'acides organiques peut être utilisée comme source de carbone sans qu'il y ait formation de gaz. Une réaction acide est observée dans un milieu de sels minéraux contenant un hydrate de carbone et on a observé la production d'une quantité importante de polysaccharides extracellulaires. Le milieu le plus utilisé pour la culture des *Rhizobium* est le milieu yeast mannitol agar (YMA). Les souches apparaissent au bout de 3 à 5 jours après incubation à 25-30°C. Elles ont une forme circulaire, convexe de 2 à 4 mm de diamètre. Ils sont capables d'entretenir une symbiose avec les plantes de la famille des légumineuses afin d'amorcer la fixation d'azote atmosphérique et sa réduction en ammonium. A quelques exceptions près, les *Rhizobiums* sont tous quasiment des symbiontes obligatoires, car ils sont incapables de fixer l'azote atmosphérique à l'état libre dans le sol [52].

2.3.3. Habitat

L'habitat naturel de *Rhizobium* s'est étendu aux tissus racinaires des plantes non légumineuses et notamment des graminées. Ainsi, plusieurs souches *Rhizobiales* appartenant à

ces différents genres, ont été isolées des racines de différentes plantes telles que le maïs et la salade [53].

2.4. Le genre *Bacillus sp*

2.4.1. Les propriétés générales

Les bactéries appartenant au genre *Bacillus sp* correspondent à des grands bacilles (Figure 05) :

- faciles à cultiver.
- aérobies stricts ou aéro-anaérobie facultatifs.
- possédant une catalase.
- leurs dimensions varient de $(0,5 \times 1,2 \mu\text{m})$ à $(2,5 \times 10 \mu\text{m})$.
- forme rectangulaire et mobile.
- Isolés ou groupés en chaînes.
- possédant des spores terminale, subterminale ou centrale, avec une forme ovoïde.
- thermorésistante (résistant à 100°C et donc la pasteurisation).
- Ils cultivent bien sur milieux ordinaire dans de larges limites de température ($12-45^{\circ}\text{C}$) et de pH (6 - 8,5). La plupart se développent plus vite à 30°C qu'à 37°C .
- Leur culture est abondante en 24h, en bouillon comme en gélose.
- les colonies ont un diamètre compris entre 2 et 7 mm, elles sont soit circulaires soit de forme irrégulière avec des bords ondulés, filamenteux, leur aspect est crémeux et lisse ou mat ou granuleux.
- Ils hydrolysent des macromolécules organiques dont la nature varie suivant leur équipement enzymatique: gélatinase, amidon.
- Ils tirent leurs énergies par respiration ou fermentation.
- Ils sont hétérotrophes, saprophytes et ubiquitaires [54].

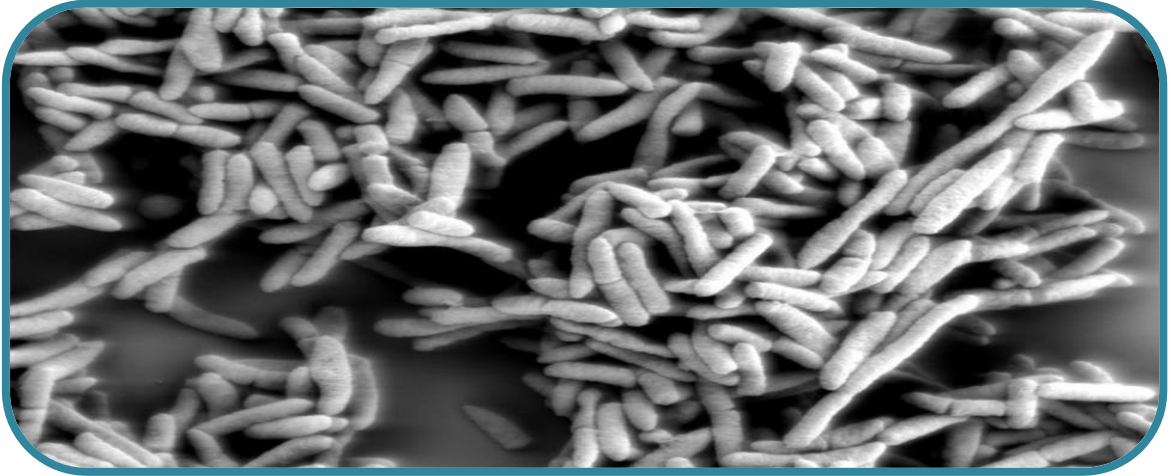


Figure 05 : Observation par microscope électronique d'une souche de *Bacillus sp* [56].

2.4.2. Habitat

Ce genre regroupe un grand nombre d'espèces très répandues dans la nature. Leur habitat principal est le sol où ils joueraient un rôle dans les cycles du carbone et de l'azote, dans lequel la variété de la flore en *Bacillus* sera en fonction de la richesse en matières organiques (*B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. cereus* pour les sols les plus pauvres) [55].

2.4.3. Classification

Tableau 03 : classification de genre *Bacillus sp* [57].

Règne	<i>Bacteria</i>
Embranchement	<i>Firumicutes</i>
Classe	<i>Bacilli</i>
Ordre	<i>Bacillales</i>
Famille	<i>Bacillaceae</i>

2.5. Le genre *Azotobacter sp*

Azotobacter est un genre bactérien appartenant à la sous-classe des *Gammaproteobacteria*. Les cellules du genre *Azotobacter* sont des bacilles à Gram négatif (**Figure 06**), ovoïdes et relativement larges (2 à 4 μm , jusqu'à 6 μm) et peuvent prendre

Chapitre 02 : Les Rhizobactéries.

plusieurs formes (cocci ou bâtonnets) non sporulés, mobiles grâce à des flagelles multiples. Ce sont des bactéries aérobies à métabolisme strictement respiratoire. Contrairement au genre *Azomonas*, les *Azotobacters* ont la capacité de former des kystes en absence de nutriments. Ceux-ci remplis de Poly- β -hydroxybutyrates (PHB) sont utilisés par les bactéries en cas de stress environnementaux comme source d'énergie [40].

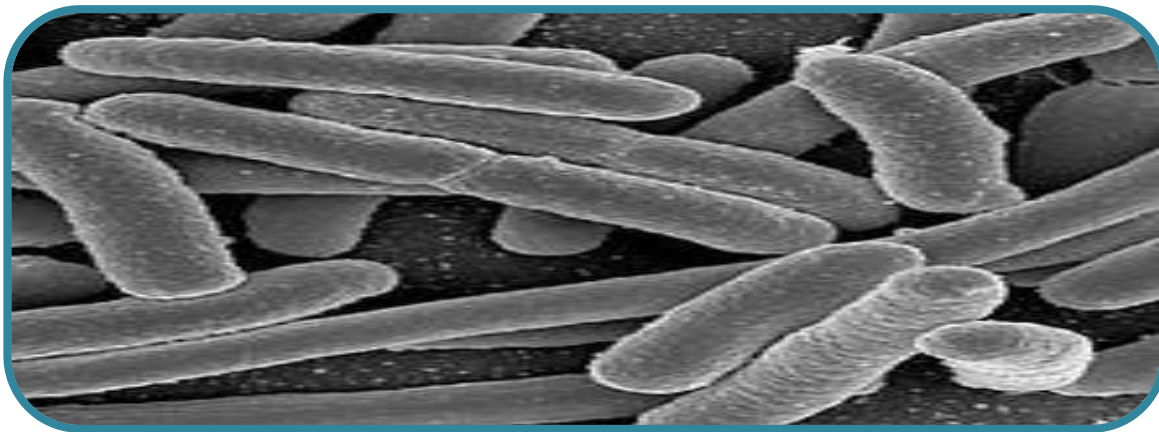


Figure 06 : Observation par microscope électronique d'une souche d'*Azotobacter sp* [58].

2.5.1. Habitat :

Les *Azotobacter* sont ubiquitaires et peuvent être isolés de l'eau et du sol où ils y vivent librement. Cependant, ils sont beaucoup plus nombreux au voisinage des racelles. Bien qu'ils n'en soient pas dépendants, ils sont plus abondants près des racines et dans la rhizosphère qu'ailleurs dans le sol. Les *Azotobacter* préfèrent les sols neutres ou légèrement alcalins, bien oxygénés et moyennement humides. Ces bactéries fixent mieux l'azote atmosphérique dans les sols où les apports d'azote minéral sont réduits. Elles peuvent fixer au moins 10 μ g d'azote/g du glucose consommé. La fixation nécessite les ions molybdène. Ces bactéries exigent néanmoins des apports organiques importants probablement comme source de carbone. Il semblerait que ces bactéries aient d'importantes facultés à utiliser les apports minéraux sous forme insoluble qu'ils s'agissent de phosphates ou de nitrates [40].

Les bactéries du genre *Azotobacter sp*, en plus d'être des diazotrophes, jouent un rôle important dans le cycle de l'azote. *Azotobacter sp* étant qualifié de PGPR synthétise des substances biologiquement actives telles que les phytohormones (les auxines) stimulant ainsi la croissance des plantes. Ils facilitent également la solubilité de certains minéraux dans le sol et améliorent la biorestauration des sols [40].

3. Effets bénéfiques des rhizobactéries

Les effets des rhizobactéries sont regroupés traditionnellement en directs et indirects. Bien que la différence entre les deux ne soit pas toujours évidente. Les mécanismes directs sont ceux agissant à l'intérieur des plantes et affectent directement leur métabolisme tandis que les mécanismes indirects, en général, sont ceux qui se produisent en dehors des plantes (**Figure 07**). Les mécanismes directs comprennent les processus de biofertilisation (solubilisation des phosphates) et de biostimulation (production des phytohormones) : l'acide indole acétique, les cytokinines, l'acide gibbérellique...). Les processus de biocontrôle (production des métabolites antifongiques, production de composés volatiles...) constituent des mécanismes indirects [40].

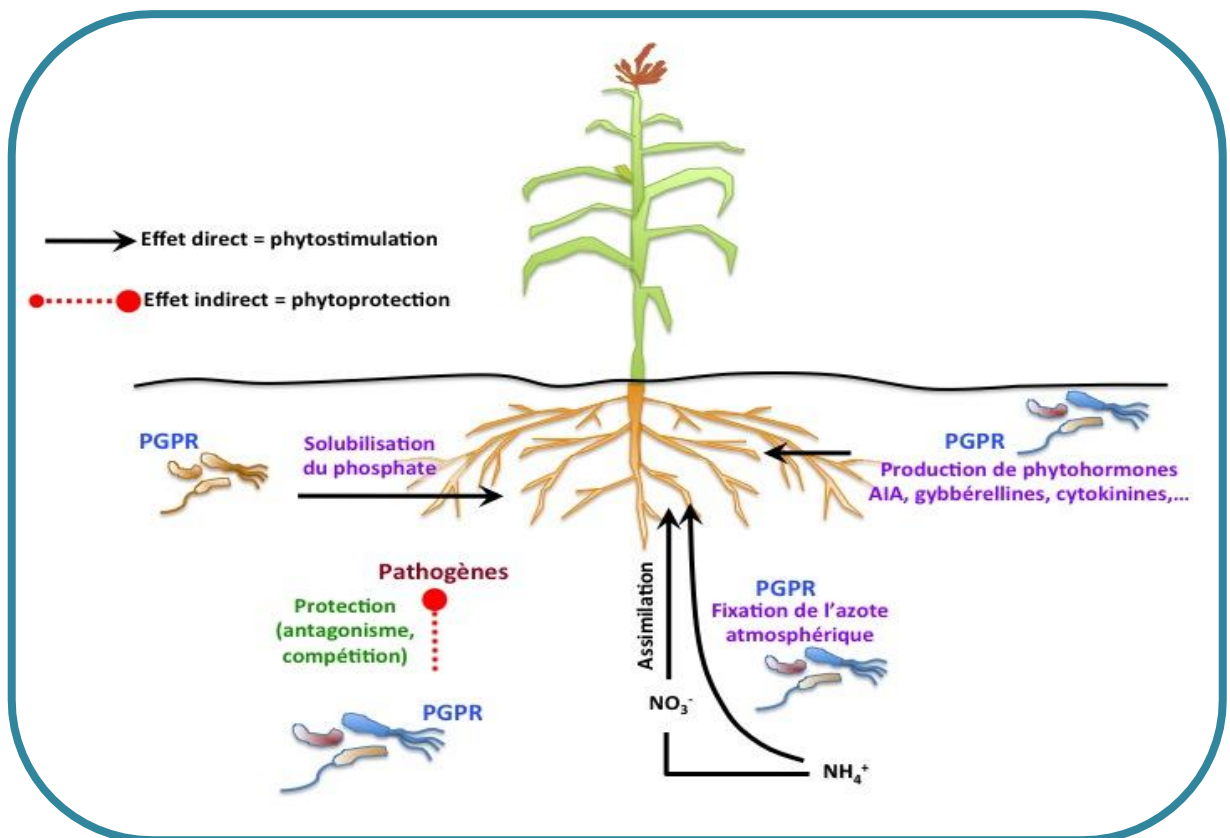


Figure 07 : Interactions entre plantes et les bactéries coopératives (PGPR) dans la rhizosphère [58].

3.1. La solubilisation du phosphate

Le phosphore est un macronutriment indispensable à la croissance et au développement des plantes mais aussi un important élément nutritif limitant cette croissance. Il joue un rôle

Chapitre 02 : Les Rhizobactéries.

essentiel dans le transfert d'énergie nécessaire à la croissance et l'amélioration de la productivité des végétaux. Malgré son abondance dans le sol il n'est assimilable par les plantes qu'une fois solubilisé. La solubilisation des phosphates est la capacité des microorganismes de convertir le phosphate insoluble à une forme accessible (**Figure 08**). Ce processus permet de réduire l'utilisation d'engrais phosphatés. Les bactéries rhizosphériques solubilisant le phosphate pourraient donc constituer une source prometteuse comme agent biofertilisants dans l'agriculture. La solubilisation des phosphates est le résultat de l'acidification, de la chélation, des réactions d'échange d'ions et de production d'acides organiques de faible poids moléculaire. Le principal mécanisme de solubilisation est souvent la production d'acides gluconique et 2-cétogluconique [40].

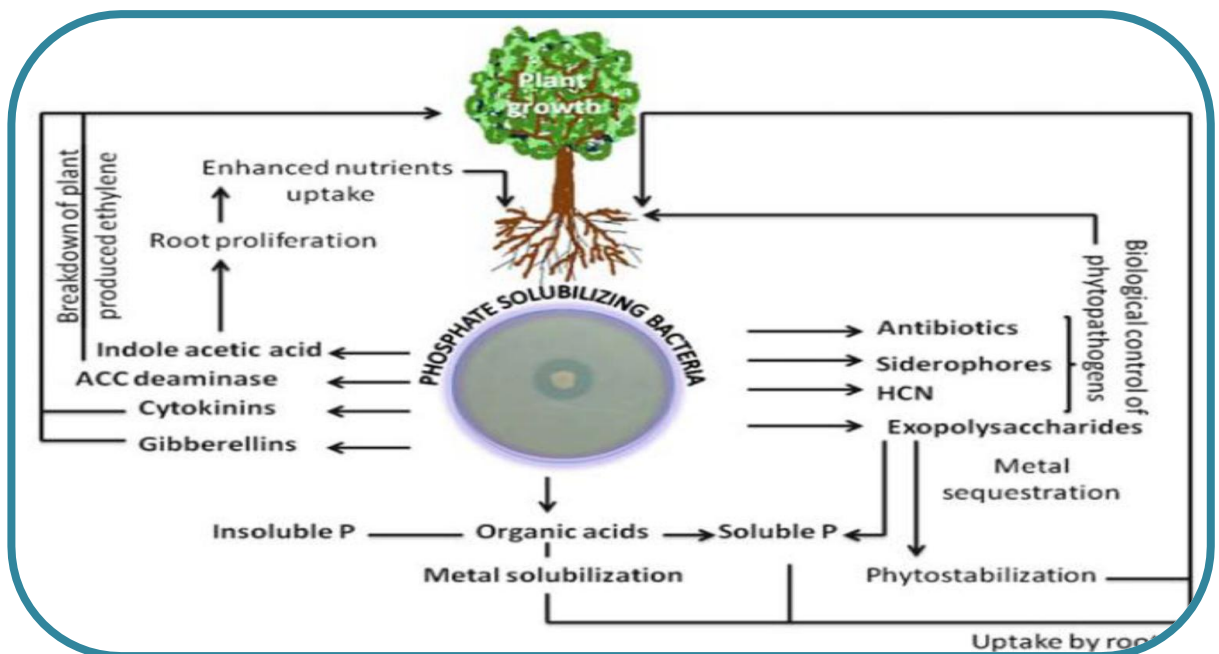


Figure 08 : Mécanismes de l'amélioration de la croissance des plantes par des bactéries solubilisant le phosphate [40].

3.2. La production des sidérophores

Le fer est un élément capital pour les bactéries, les champignons et les plantes. Il participe dans les réactions d'oxydo-réduction. Cet élément est abondant dans le sol et se présente sous forme d'oxyde de fer mais il demeure souvent un facteur limitant pour la croissance de la flore bactérienne et de celles des plantes. La faible biodisponibilité du fer dans la rhizosphère entraîne une compétition accrue. Sous des conditions limitantes en fer, les

Chapitre 02 : Les Rhizobactéries.

PGPR synthétisent des composés à faible poids moléculaires généralement inférieur à 1 KDa appelés " sidérophores" [40].

L'implication des sidérophores dans l'antagonisme entre les populations microbiennes est le résultat de la disponibilité limitante du fer qui affecte la croissance et le développement microbien dans la rhizosphère. Une compétition pour cet élément s'installe entre les microorganismes. La production de sidérophores et la capacité de les assimiler devient alors un avantage écologique dans la rhizosphère. Les sidérophores libérés par les PGPR chélatent le fer minéral par la formation d'un complexe soluble Fe^{3+} . Le fer complexé au sidérophore n'est assimilable que par les microorganismes producteurs ou possédants des récepteurs membranaires spécifiques capables de le reconnaître et de le transporter par un mécanisme actif. Privée de fer, la flore tellurique nuisible ralentit sa croissance et sa densité diminue dans la rhizosphère [40].

Les sidérophores sont synthétisés par des bactéries telles *Bacillus sp*, *Pseudomonas sp*, *Azotobacter sp*. Certaines bactéries du genre *Pseudomonas* ont un grand pouvoir de chélation du fer. Elles peuvent reconnaître et utiliser les sidérophores produits par d'autres souches alors que ces dernières ne sont pas capables d'utiliser le sidérophore qu'elles produisent. Cette particularité peut favoriser la souche dans le processus de la colonisation et la compétition pour le substrat mieux que d'autres micro-organismes rhizosphériques [40].

Bien que les sidérophores soient principalement spécifiques du fer, ils peuvent aussi complexer d'autres métaux lourds toxiques en augmentant leur solubilité. En outre, ils contribuent à la production des biopesticides et des agents de biocontrôle et favorisent la solubilisation des phosphates. Enfin, ils ont d'autres fonctions biologiques telles que l'amélioration de la fixation d'azote et l'augmentation de la nodulation (**Figure 09**) [40].

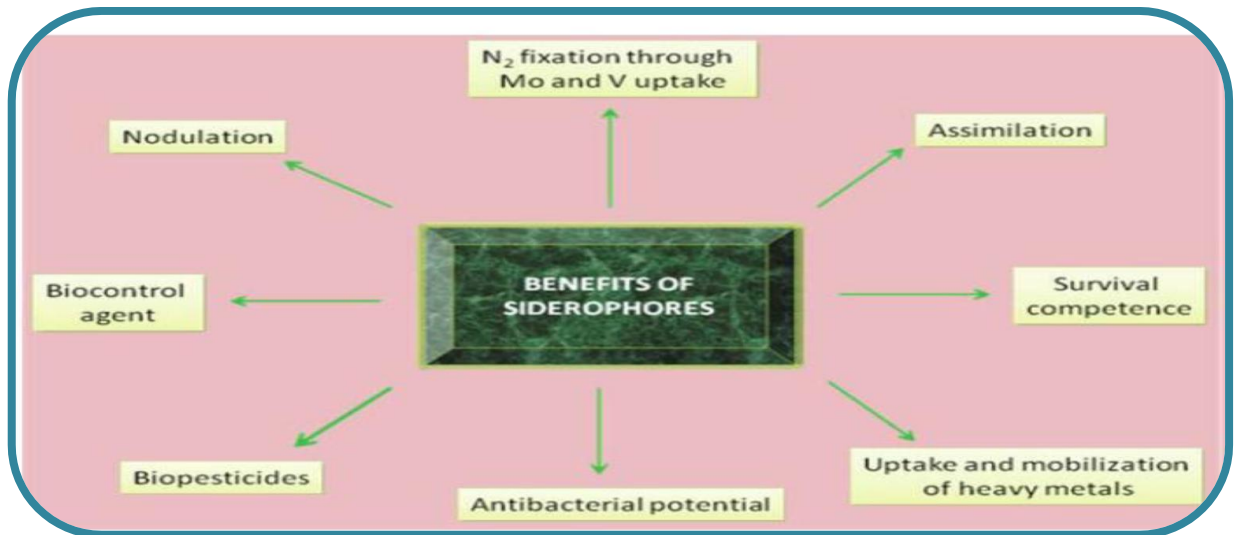


Figure 09 : Les fonctions biologiques des sidérophores [40].

3.3. Fixation d'azote

Parmi les éléments nutritifs nécessaires, celui qui est le plus souvent limitant pour la croissance des plantes est l'azote. La majeure partie de cet élément se trouve sous forme d'azote gazeux (N_2) inaccessible aux animaux et aux plantes. La fixation symbiotique de l'azote a été l'un des premiers mécanismes bactériens identifiés dans la rhizosphère des végétaux comme susceptible d'induire une augmentation de la croissance des plantes. Les microorganismes à associations symbiotiques produisent 80% de l'azote et le reste provient des systèmes libres ou associés. La fixation biologique de l'azote relève uniquement du domaine des procaryotes grâce à la nitrogénase, une enzyme catalysant la réduction de l'azote atmosphérique en ammoniac, formé de deux métalloprotéines : la dinitrogénase réductase, homodimère de deux chaînes identiques (32KDa), contenant un centre 4Fe-4S, et dinitrogénase, hétérotétramère constitué de deux chaînes α (59KDa) et β (54KDa), de 4 centre 4Fe-4S et de deux cofacteurs contenant du fer, du soufre et du molybdène (FeMo-Co), impliqués dans le processus de réduction du diazote [40].

3.4. La production des phytohormones

Les hormones végétales sont des messagers chimiques qui affectent la capacité de la plante à réagir à son environnement. Sans compter qu'elles jouent un rôle important dans la réponse de la plante aux stressés biotiques et abiotiques. De nombreux travaux indiquent que

Chapitre 02 : Les Rhizobactéries.

l'utilisation des hormones en tant que molécule- signal ne sont pas destinées seulement aux plantes mais participent également à la communication entre les bactéries et d'autres micro-organismes ou ISR. Il existe cinq principaux groupes d'hormones: les auxines, les gibbérellines, l'éthylène, les cytokinines et l'acide abscissique [59].

3.4.1. Les auxines

L'auxine a été la première hormone végétale identifiées, dans les années 1920. Elle est synthétisée au niveau des bourgeons apicaux, puis transportée par les tissus vivants jusqu'aux racines ou elle s'accumule [59].

Le rôle de ces molécules peut être résumé dans les points suivant [59] :

- Favorise la croissance (élongation des cellules).
- Inhibe la croissance des bourgeons latéraux (dormance apicale).
- Empêche la chute des feuilles et des fruits.
- Peut contrôler l'abscission des fruits.
- Elongation des racines et dans la prolifération des poils absorbants.
- Développement des tiges et des racines : croissance des bourgeons auxiliaires.
- Développement des fleurs et des fruits.

3.4.2. Les gibbérellines

Ce sont produites à la fois par les champignons et les plantes supérieures, le seul groupe d'hormone végétale qui peut être caractérisées par leur structure chimique plutôt que par leur activité biologique. Les gibbérellines appartiennent à une grande famille chimique dont la structure de base est l'entakaurène. Elles stimulent l'allongement des tiges, la croissance des feuilles et des fruits et lèvent la dormance des semences et des bourgeons [59]. Les GB présentent des formes conjuguées (souvent avec du glucose), qui constituent des réserves temporaires constatées dans différents organes : graines de Haricot, de Tomate, de Céréale. Les GB artificielles sont utilisés pour obtenir des fruits sans fécondation, pour provoquer l'induction florale ou encore pour lever la dormance de certaines graines. Des inhibiteurs de GB (antigibbérellines) sont utilisés pour réduire l'allongement des cellules et donc la vitesse de croissance [60].

3.4.3. La réduction de la production de l'éthylène

C'est un hydrocarbure gazeux simple dont la formule chimique est $H_2C=CH_2$. Il est produit en quantité importante par les fleurs à la floraison et par les fruits lors du murissement. Il provoque la chute des feuilles et active en générale leur maturation. L'application d'éthéphon a des effets très divers [59].

Aux conditions de culture défavorables, telles que la sécheresse et la salinité, la production de ce gaz augmente par la plante, ce qui rend son rôle néfaste au lieu d'être bénéfique. Certains microorganismes possèdent une enzyme ACC deaminase qui est capable de réguler la production de l'éthylène [61].

3.4.4. La production des cytokinines

Sont des composés relativement simples qui agissent comme des facteurs de croissance [62], et produites principalement dans les racines puis transportées dans l'ensemble de la plante. Elles sont présentes sur les sites d'action de L'AIA, et peuvent interagir avec cette dernière, et aussi sont souvent synthétisées sur place [63].

La première cytokinine naturelle a été extrait en 1964 des semences de maïs. Les cytokinines sont produites principalement par les racines. Elles agissent fréquemment en association avec d'autres hormones, en particulier l'auxine. Elles stimulent la division cellulaire et la synthèse de protéine. Le rôle des cytokinines sur la croissance des fruits a été démontré chez certaines espèces (bananes, tomates, pommes). En culture in vitro, les cytokinines sont utilisées pour stimuler le bourgeonnement [59].

3.4.5. L'acide abscissique

Inhibe de nombreux phénomènes de croissance et de développement, et prolonge la dormance des bourgeons et des graines. Cette hormone, appelée parfois hormone de détresse ou de stress, entre en action chaque fois que les conditions environnementales du végétal lui sont défavorables (froid, blessure) en contrôlant l'ouverture et la fermeture des stomates [59].

3.5. Lutte biologique

Les PGPR jouent un rôle majeur dans la lutte biologique, elles peuvent supprimer un large spectre de maladies bactériennes, fongiques et parasitaires, comme elles peuvent aussi procurer une protection contre les maladies virales. De nombreux travaux présentent la diversité des agents microbiens impliqués dans la lutte biologique, l'antibiose est probablement le mécanisme le plus connu et peut-être le plus important utilisé par les PGPR pour limiter l'invasion de pathogènes dans les tissus de la plante-hôte [40].

3.5.1. Composés volatiles

Certains gaz volatiles sont connus par leur action négative sur le métabolisme des racines et constituent un moyen efficace et compatible avec l'environnement dans la lutte biologique contre les mauvaises herbes. L'acide cyanhydrique est un métabolite secondaire dont la glycine est le précurseur. Bien que le cyanure soit un inhibiteur métabolique général, il est synthétisé, excrété et métabolisé par certains organismes dont les bactéries comme un moyen d'éviter la prédation ou la compétition. Les plantes hôtes ne sont généralement pas affectées par le cyanure bactérien. La production de HCN est une activité très commune chez les genres *Pseudomonas sp* (88,89%) et *Bacillus sp* (50%) dans le sol rhizosphériques. De plus, plusieurs études montrent que l'HCN améliore la croissance des plantes [40].

1. La Taxonomie

La science du classement des individus est appelée taxonomie (ou taxinomie) ou systématique [64]. Un classement consiste à former des groupes d'individus qui se ressemblent selon des critères prédéfinis et à éliminer ceux qui s'en distinguent qui pourront former un autre groupe avec leurs semblables. Ces groupes sont appelés taxons. Deux ou plusieurs taxons peuvent, si on assouplit les critères en ne tenant plus compte de certains caractères distinctifs, être à leur tour groupés en un nouveau taxon d'un niveau hiérarchique supérieur qui comprendra un plus grand nombre d'individus. De regroupements en regroupements, on arriverait à faire rentrer tous les individus dans un même ensemble [65].

La taxonomie est essentielle pour l'identification et la nomenclature des souches bactériennes. Les échelons hiérarchiques sont : règne, embranchement, classe, ordre, famille, genre et espèce. On utilise parfois des échelons intermédiaires : sous-embranchement, tribu (sous famille), ou sous espèce [64]. La taxonomie recouvre trois domaines différents: la classification, la nomenclature et l'identification :

- La classification établit des taxons selon des critères phénotypiques et moléculaires.
- La nomenclature affecte un nom à ces taxons selon un système binomial dans lequel un nom latin du genre précède le nom d'espèce.
- L'identification assigne les souches inconnues à l'un des taxons décrits [66].

Selon la nature des caractères étudiés, la taxonomie peut être divisée à :

- Taxonomie phénotypique.
- Taxonomie numérique.
- Chimio-taxonomie.
- Taxonomie moléculaire.

2. La taxonomie numérique

De manière schématique, la taxonomie numérique consiste à étudier, pour chaque souche, plus d'une centaine de caractères morphologiques, biochimiques, culturels, structuraux, et à attribuer le même poids à chacun des caractères qui sont codés 1 (présence du caractère) ou 0

Chapitre 03 : Taxonomie numérique.

(absence du caractère). Le but recherché est de rassembler dans une classe de similitude les individus les plus semblables.

L'analyse mathématique de quantités importantes de données permet le calcul des distances existant entre différents groupes taxonomiques. Les résultats obtenus peuvent être représentés graphiquement sous forme de dendrogramme [67].

Selon Anderegg (1973), les étapes qui composent la démarche de la taxonomie numérique sont les suivantes [68] :

1-Choix des objets d'étude: ce sont les taxons concernés par l'analyse. Ils ne doivent pas être très diversifiés sur le plan systématique.

2-Choix des caractères qui servent à la description des objets : les paramètres choisis décrivent bien les individus quelque soit leur position systématique. Ils doivent présenter deux états de caractères (1,0) **Ex. :** on ne choisit pas le paramètre production de méthane pour des taxons strictement aérobies

3-Codification des données et élaboration de la matrice : les états des paramètres préalablement choisis, sont affectés du symbole **1** ou **0** pour coder leur présence ou leur absence.

4-Choix de l'algorithme de classification : en fonction des objectifs et des données, le microbiologiste tranchera pour l'un ou l'autre algorithme de construction de l'arbre

5-Calcul du graphe arborescent (le phénogramme) : une fois l'algorithme choisis, la construction de l'arbre est réalisée sur un logiciel approprié (Mega, Phylowin, Phylogen...)

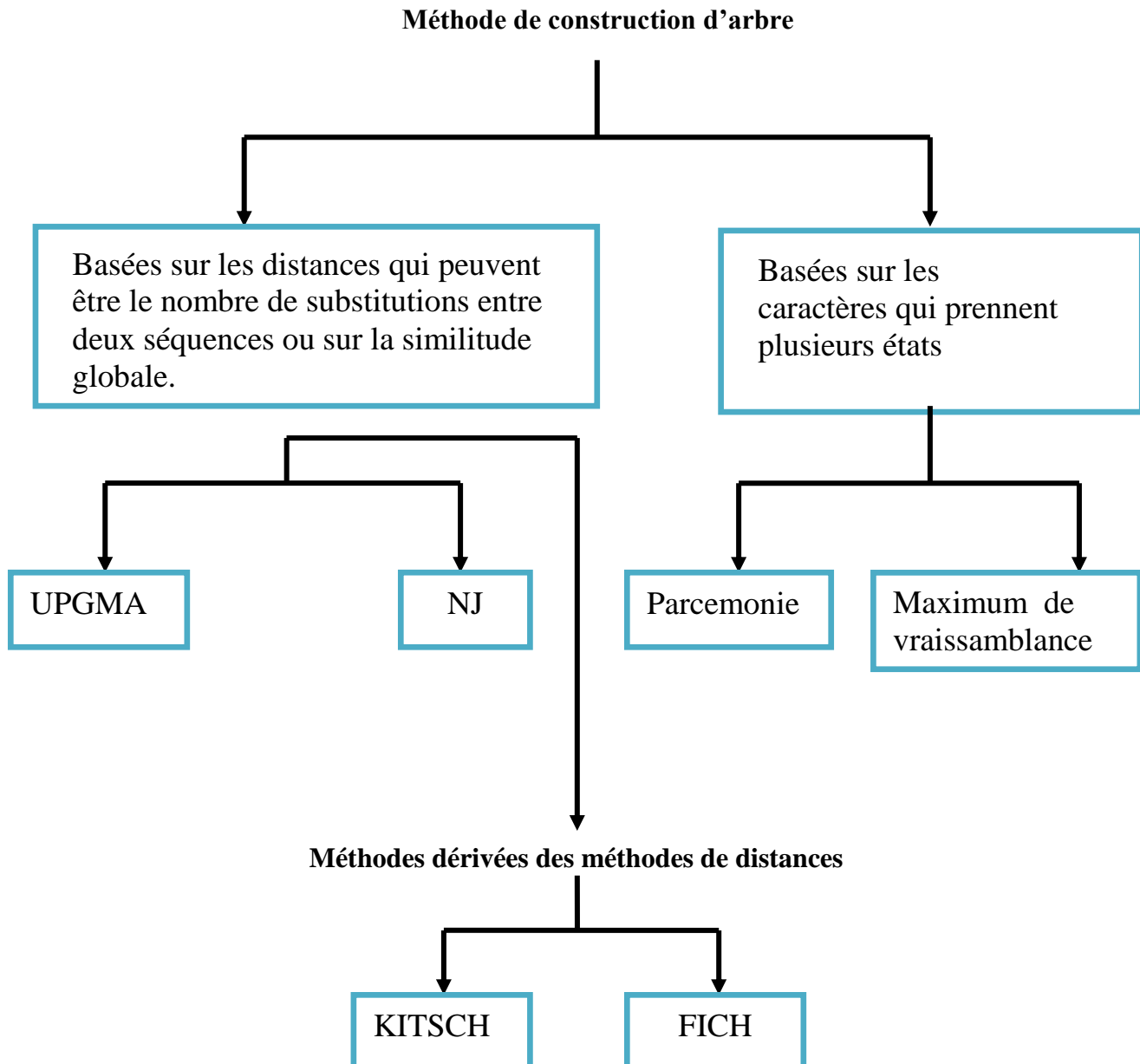
6-Interprétation des résultats : l'interprétation de l'arbre est basée sur la topologie obtenue.

Logigramme 1 : La démarche de la taxonomie numérique (Anderegg, 1973) [68].

Chapitre 03 : Taxonomie numérique.

Remarque : l'enracinement de l'arbre n'est pas une obligation absolue, mais une nécessité par rapport à la qualité des clades obtenus [68].

Il existe plusieurs méthodes pour calculer des arbres phylogénétiques ; ces méthodes peuvent se regrouper en deux catégories :



Les méthodes de distances sont basées sur l'utilisation d'une matrice où sont consignées les distances calculées pour toutes les combinaisons deux par deux des OTUS

Chapitre 03 : Taxonomie numérique.

(operational taxonomic units). L'application des algorithmes plus ou moins complexes permet de déduire, à partir de la matrice de distance, les relations phylogénétiques des OTUS sous forme de dendrogrammes et de rassembler dans un même clade de similitude les espèces les plus rapprochées. On peut citer deux principales méthodes de construction d'arbre :

- La méthode UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic mean)
- La méthode de Neighbor-Joining (NJ) [68].

Annexe 2 : Tableau de la matrice binaire des caractères étudiés des bactéries Gram positif.

Caractères		Caractères morphologiques				Source de carbone																Source d'azote														
		Forme	Mobilité	Oxydase	Catalase	Arabinose	Fructose	Galactose	Glucose	Inositol	Lactose	Maltose	Mannitol	Mannose	Rhamnose	Saccharose	Sorbitol	Surbose	Xylose	Xylitol	P. sodium	Su. sodium	Arginine	Proline	Thiamine	Tyrosine	Alanine	Histidine	Glycine	Méthionine	Valine	Leucine	Tryptophane	Trypsine	Asparagine	
Souches																																				
KES4	B1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	
KRO10	B2	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	
KEK10	B3	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0	0		
FEK16	B4	0	0	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	
FES5	B5	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0
FRS2	B6	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1

Annexe 2 : tableau de la matrice binaire des caractères étudiés des bactéries Gram positif.

SOUCHE		Auxine	Sidérophore	Phosphte	Caractères biochimiques									
					VP	RM	NIT	H2S	CO2	ONPG	URE	TRP	CIT	IND
KES4	B1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0
KRO10	B2	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0
KEK10	B3	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0
FEK16	B4	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0
FES5	B5	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0
FRS2	B6	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0

1. Les souches étudiées

Notre étude a porté sur 13 isolats rhizosphériques non-identifiées isolées à partir de rhizosphère de piment (*Capsicum annuum*), elles sont noté : BEK2, BEK8, FEK16, FEK22, FES5, FRS2, KEK10, KES4, KRK1, KRK14 et KRO10, T1, T5. Les souches sont fournit par le laboratoire de génie microbiologique et applications de l'université de Constantine, qui a montré que ces souches ont la capacité de produire les sidérophores, les auxines et de solubiliser le phosphate inorganique, à partir de ce point, nous avons réalisées des travaux dans les laboratoires de microbiologies de l'université 8 Mai 1945, Guelma pour mieux comprendre et déterminer les différentes activités métaboliques de ces bactéries.

2. Les milieux de culture

- Les milieux d'isolement et de conservation : GN pour les 13 souches.
- Le Milieu Sierra : pour la mise en évidence de l'hydrolyse de tween 80.
- Le milieu TSI : pour la mise en évidence de la production d'H₂S.
- Bouillon nutritif à 0,1% de KNO₃ : milieu pour la mise en évidence de la production de nitrate réductase.
- CarboxyMéthyl Cellulose-agar (CMC) : pour la mise en évidence de la dégradation de cellulose.

3. Culture bactérienne et purification des souches

A partir des tubes qui contient les souches isolées sur le milieu GN incliné, quelques colonies sont prélevées etensemencées à la surface du même milieu sur boite de pétri par des strie sérés à l'aide d'une anse de platine. Les boites sont incubées pour une durée de 48h à 72h dans une étuve de 37°C.

4. Tests préliminaires et morphologiques

Cette étape a pour but de vérifier la pureté des souches. Elle constitue une première orientation en fonction de la morphologie qui est l'un des critères essentiels d'identification macroscopique et microscopique. Ces derniers permettent respectivement la détermination du Gram, l'aspect des cellules, la mobilité, catalase...etc.

4.1. Coloration de Gram

La coloration de Gram est une coloration différentielle permettant le classement des bactéries en deux groupes distincts : bactéries à Gram positif et bactérie à Gram négatif.

La coloration de Gram est réalisée selon les étapes suivantes [69] :

- La suspension bactérienne est étalée en un film mince et régulier sur la lame avec une anse de platine par un mouvement régulier et circulaire.
- La culture sur la lame est séchée soit à l'air libre ou avec la flamme du bec Bensen.
- Le frottis est recouvert avec le violet de gentiane pour une minute.
- Le frottis est à nouveau recouvert avec le lugol pour une minute pour fixer la couleur du violet de gentiane
- un lavage pendant une minute est nécessaire pour l'élimination de l'excès des colorants.
- Le frottis est traité par l'alcool pendant 30secondes.
- Une contre coloration est réalisée par la fushine pendant une minute.
- Un lavage, puis un séchage de la lame sont appliqué.
- Les lames sont observées avec l'objectif à immersion.

4.2. Mobilité

La mobilité est observée en utilisant une observation à l'état frais.

4.3. Catalase

L'enzyme catalase est produit en abondance par les bactéries ayant un métabolisme respiratoire qui détruit les peroxydes et libère de l'oxygène. Sur une lame propre, une colonie bactérienne est déposée au centre, ensuite quelques gouttes de peroxyde d'hydrogène sont déposées. L'apparition des bulles de gaz indique la présence de la catalase [70].

4.4. Oxydase

L'oxydase est une enzyme catalysant une réaction d'oxydoréduction impliquant une molécule d'O₂ comme accepteur d'électron. Dans ces réactions, l'oxygène est réduit en eau ou en peroxyde d'hydrogène (H₂O₂).

Cette étude est recherchée par la méthode des disques selon le protocole suivant :

- Placer un disque pré-imprégné sur une lame à l'aide d'une pince flambée.
- Avec une pipette pasteur prélever une colonie sur milieu solide (GN) et la déposer doucement sur le disque.
- Une réaction positive est révélée par l'apparition d'une tache violette [71].

5. Tests physiologiques et chimiques

5.2. Utilisation des sources de carbone

L'étude de l'utilisation des sources de carbone est réalisée sur un milieu minimum gélosé (**Annexe1**), les sources de carbone utilisées sont :

- Sucre: glucose, saccharose, arabinose, xylose, lactose, fructose, maltose, galactose, sucrose, inositol, mannose, rhamnose, surbose.
- Sucres Alcool: Mannitol, sorbitol, xylitol.
- Acides organiques : propionate de sodium et succinate de sodium.

Les sucres sont ajoutés au milieu de base à une concentration finale de 1%, tandis que les sucres alcool et les acides organiques à 0,1% (P/V). Après ensemencement par touche, les lectures s'effectuent à une durée d'incubation de 48h à 37°C.

L'utilisation des différents substrats est appréciée par l'appariation d'une croissance à la surface des boîtes.

5.3. Utilisation des sources d'azote

L'utilisation des différents substrats comme sources d'azotes a été étudié sur le milieu minimum. Les substrats azotés sont incorporés à une concentration finale de 0,1% (P/V).

Les différentes substances utilisées sont : tyrosine, ninhydrine, proline, méthionine, histidine, glycine, thiamine, leucine, alanine, tryptophane, arginine, valine, trypsine, asparagine. L'ensemencement est réalisé par touche, les boîtes sont incubées à 37°C dont les résultats d'assimilations sont notés après 48h.

5.4. La résistance aux antibiotiques

La mise en évidence de la sensibilité des 13 isolats aux différents antibiotiques est basée sur la méthode de l'antibiogramme par diffusion en milieu gélosé sur milieu de Muller Hilton (**Annexe1**). Les différents antibiotiques utilisés sont : la penicilline, la chloramphenicol, la gentamycine, l'erythromycine, imipenème, l'amoxicilline, cefotaxime, la vancomycine et sulphaméthoxazole. À partir d'une culture pure d'une souche de PGPR, une colonie estensemencée par des stries sérés. Ensuite, les disques d'antibiotiques y sont déposés. Après une pré-diffusion de 30 minutes, les boites sont incubées à 37°C pendant 24 heures, puis les diamètres d'inhibition sont mesurés.

5.5. Les activités de dégradation

- La dégradation de l'adénine (0,1%) a été déterminée sur le milieu de base (milieu minimum). L'hydrolyse du tween 80 à (0,1%) a été testée sur milieu Sierra (**Annexe1**). Pour ces composés insolubles, l'activité de dégradation est notée après 2 jours d'incubation par l'apparition, autour des colonies, des zones claires.

- **La dégradation de l'amidon**

Ce test est réalisé sur milieu minimum contenant 1% (P/V) d'amidon soluble. Après 2 jours d'incubation à 37°C, la gélose est recouverte par une solution de lugol. La dégradation est ainsi mise en évidence par l'absence de coloration autour des colonies. A l'inverse, les zones contenant de l'amidon se colorent en brun.

- **La dégradation de la gélatine**

Les souches sontensemencées par touche sur un milieu minimum contenant 0,4% (P/V) de gélatine puis incubées 2 jours à 37°C. Les zones où la gélatine n'est pas dégradée s'opacifient lorsqu'une solution de chlorure mercurique est versée sur la gélose. Les zones claires correspondent aux zones de dégradation de la gélatine.

➤ **La dégradation de la caséine**

La dégradation de la caséine est étudiée sur un milieu gélosé contenant 5% (P/V) de caséine. Les boîtes ensemencées sont observées après 2 jours d'incubation à 37°C. La clarification de la gélose autour des colonies témoigne de la dégradation.

➤ **La dégradation de la cellulose**

A partir d'une culture pure des isolats, une colonie est prélevée, ensuite déposée sur boîte contenant du CMC gélosé (**Annexe1**). La production de cellulase est mise en évidence par la coloration à la solution Iodine (Gram) (**Annexe1**). Pour ce faire, un volume de 10 ml est coulé dans la boîte. Les colonies développant une auréole montre que les souches en question possèdent une activité cellulase.

5.6. La croissance en présence d'inhibiteurs chimiques

Le milieu minimum (**Annexe1**) est additionné de composés inhibiteurs aux concentrations suivantes: phénol (0,1 P/V), crystal violet (0,0001 P/V). La présence ou l'absence de la croissance est enregistrée après 2 jours d'incubation à 37°C.

➤ **Effet de NaCl sur la croissance des PGPR**

Ce test est réalisé sur un milieu minimum additionné de 1% de glucose, le NaCl est rajouté à différentes concentrations : 2%, 4%, 6%, 7%, 8% et 13%. Après ensemencement, les boîtes sont incubées à 37°C pendant 2 jours d'incubation. La présence ou l'absence de croissance est notée comme suivant:

- Croissance absente (-).
- Croissance faible (±).
- Croissance modérée (+).
- croissance abondante (++)

➤ **Effet du pH sur la croissance des PGPR**

Afin d'étudier le pH optimale et maximale de croissance, les souches sont cultivées sur un milieu minimum à différentes valeurs de pH: 4, 5, 6, 7, 7.5, 8, 9. La croissance des souches est évaluée visuellement après 2 jours d'incubation à 37°C. Quatre niveaux d'appréciation sont retenus:

- Croissance absente (-).
- Croissance faible (±).
- Croissance modérée (+).
- Croissance abondante (++)

➤ **La résistance des bactéries aux pesticides**

L'étude de la résistance des bactéries aux pesticides est réalisée sur un milieu de base minimum. Les différents pesticides testés sont : Topik, Tilt, sulfo, tryp.

Les divers pesticides sont ajoutés au milieu de base stérilisé encore en surfusion, afin d'obtenir une concentration finale de 1% et 5%. Après ensemencement des milieux avec des souches par des stries, la lecture s'effectue après 3 jours d'incubation à 37°C.

La résistance des bactéries aux différents pesticides appréciés par la présence d'une culture sur le milieu.

5.7. La galerie classique

9 tests ont été effectués :

- 1- Test de l'Uréase.
- 2- Test de l'indole.
- 3- Test du citrate.
- 4- Test mannitol mobilité.
- 5- Test VP.
- 6- Test RM.
- 7- Test ONPG.
- 8- Test nitrate-réductase.
- 9- Test TSI.

5.8. La galerie API20 NE

La galerie API 20NE est un système standardisé pour l'identification des bacilles à Gram négatif non entérobactéries et non fastidieux comporte 20 micro-cupules contenant des substrats déshydratés. Les tests conventionnels sont inoculés avec une suspension bactérienne saline qui reconstitue les milieux. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs. Les tests d'assimilation sont inoculés avec un milieu minimum ainsi les bactéries cultivées seulement sont capables d'utiliser le substrat correspondant. La lecture des résultats se fait à l'aide du tableau de lecture et l'identification par un logiciel d'identification [72].

➤ **Préparation de la galerie**

Le fond et le couvercle d'une boîte d'incubation sont réunis, ensuite environ 5 ml d'eau distillée stérile sont réparties dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide. La référence de la souche est inscrite sur la languette latérale de la boîte [72].

➤ **Préparation de l'inoculum**

A partir d'une culture jeune (18-24heures), une à quatre colonies morphologique identique sont prélevées par des touches successives puis mises en suspension dans une ampoule API contenant du NaCl 0,85%. Une densité suffisante (0,5 de Mac farland) (**Annexe1**) est exigée [72].

➤ **Inoculation de la galerie**

- Remplie les tubes (et non les cupules) des tests : NO₃ à PNPG.
- Les tests GLU, ADH, URE, vont être complétés avec l'huile de vaseline.
- remplie les tubes et les cupules des tests de /GLU / à /PAC/.
- Refermer la boîte d'incubation, coder et placer a 37°C pendant 24h à 48h.
- Après l'incubation, on réalise le test NO₃ et TRP :
 - ✓ Dans la cupule NO₃ des gouttes de réactifs Nit1 et Nit 2 sont ajoutées, après 5minutes on ajoute Zn pour 5minutes.
 - ✓ Dans la cupule de TRP on ajoute des gouttes de réactifs de kovacs (**Annexe2**).

6. Taxonomie numérique

Afin d'étudier la ressemblance entre les souches étudiées. Une matrice binaire est établie en regroupant tous les caractères étudiés. Les matrices des bactéries à Gram négatif et les bactéries à Gram positif sont réalisées séparément. Le codage est établi selon le tableau ci-dessous. Les matrices de distance et les arbres établis sont réalisés par le logiciel Past 3.

Tableau 05: Codage des états des caractères.

	Code 1	Code 0
Forme	bacille	Coque
Mobilité	mobile	Immobile
Tests physiologiques	pousse	Pas de pousse
Tests biochimiques	Résultat positif	Résultat négatif

Résultats et discussion

1. Tests morphologiques et préliminaires

Ces tests sont réalisés afin de s'orienter vers la galerie Api la plus convenable pour l'identification phénotypique des souches, il s'agit de : la coloration de Gram, la mobilité, le test de catalase et d'oxydase. Les résultats de ces tests sont mentionnés dans le (Tableau 05).

Tableau 05 : Morphologique et tests préliminaires pour l'identification des souches.

	Gram	Mobilité	forme	oxydase	Catalase
BEK2	-	+	Bacille	+	+
BEK8	-	+	Bacille	+	+
KRK1	-	+	Bacille	+	+
KRK14	-	+	Bacille	+	+
KEK10	+	-	Bacille	+	+
KES4	+	-	Bacille	+	+
KRO10	+	-	Cocci	+	+
FEK16	+	-	Cocci	+	+
FEK22	-	+	Bacille	+	+
FRS2	+	-	Cocci	+	-
FES5	+	+	Cocci	+	+
T1	-	+	Bacille	+	+
T5	-	+	Bacille	+	+

L'observation des souches au microscope après la coloration de Gram a révélée la présence de deux formes : bacilles et coques (**Figure 10**).

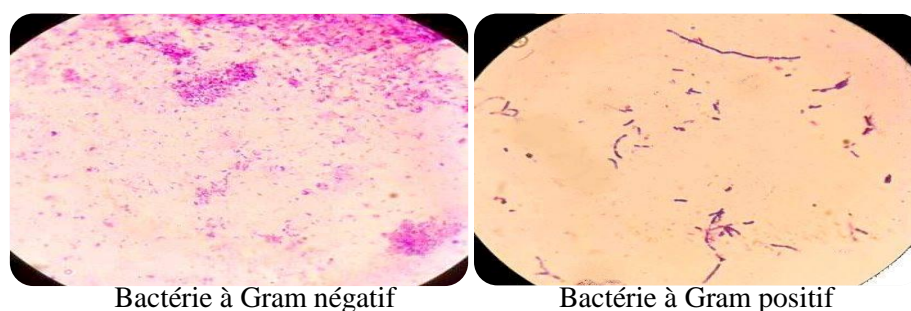


Figure 10 : Observation microscopique de la coloration de Gram ($\times 100$)

Résultats et discussion

Comme il montre le tableau précédent, l'observation à l'état frais entre lame et lamelle a prouvée la présence de mobilité de quelques souches que pour la plupart appartient aux bactéries à Gram négatif. De plus, toutes les souches possèdent un cytochrome oxydase et une catalase à l'exception de la souche FRS2 qui ne dégrade pas l'eau oxygénée.

2. Tests physiologiques et biochimiques

2.1. Utilisation de sources de carbone

Les résultats de l'assimilation des substrats carbonés sont rapportés sur le (Tableau 06). Les isolats diffèrent par leurs capacités à utiliser les sources de carbone (Figure 11). Tous les isolats sont capables d'utiliser le D-fructose et le D-mannitol. La souche FRS2 utilise toutes les sources, suivie des souches KES4 et FEK16 qui assimilent 15 et 14 sources, respectivement. Cependant, les souches T5 et BEK8 utilisent seulement 11 et 10 sources respectivement.

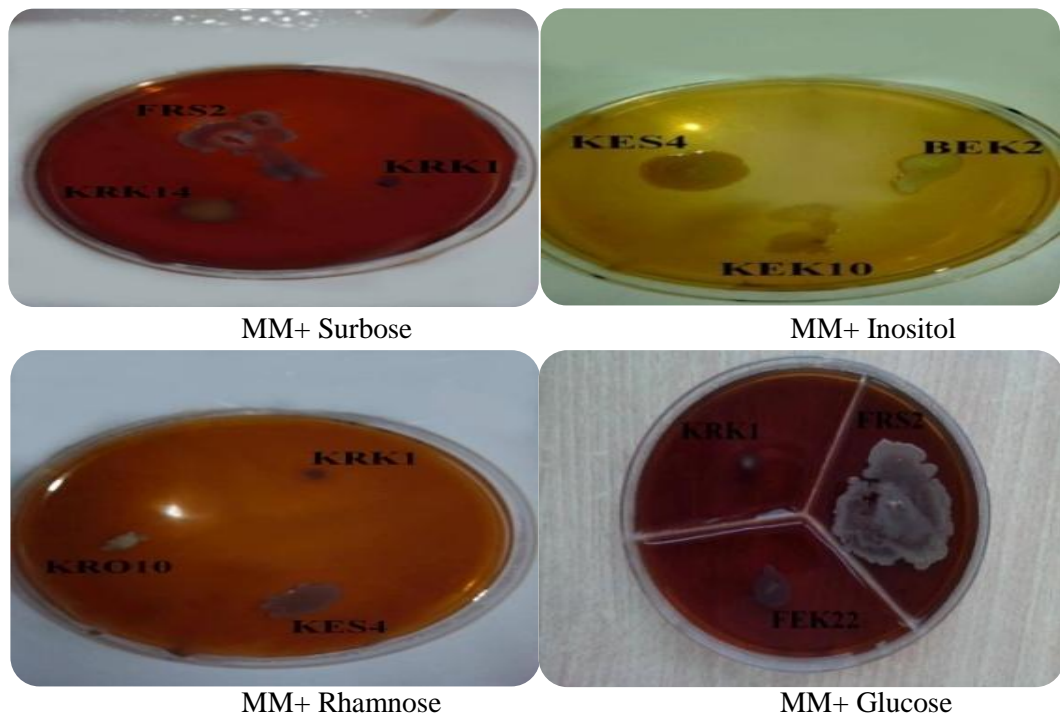


Figure 11: Photographies de l'utilisation des sucres de carbone.

Du point de vue biologique, une source de carbone est un nutriment (sucre, acide gras, acide aminé...etc.) fournissant le carbone nécessaire à la constitution de nouvelles molécules organiques (anabolisme) [45]. La versatilité nutritionnelle des PGPR ainsi que le caractère ubiquiste et le pouvoir d'adaptation à des conditions écologiques variées a été mentionnée

Résultats et discussion

dans de nombreux travaux [73]. Plusieurs études ont montré que les racines émettent différents composés carbonés et différents signaux chimiques dans leur rhizosphère qui attirent sélectivement des populations microbiennes capables de métaboliser ces molécules et qui se multiplient préférentiellement dans la rhizosphère [69].

Tableau 06 : L'utilisation des sources de carbone.

	BEK2	BEK8	FEK22	FRS2	FEK16	KEK10	KRO10	KES4	KRK1	KRK14	T5	T1	FES5
Lactose	+	±	+	++	±	+	++	++	-	++	±	±	±
Saccharose	++	++	-	++	++	++	-	++	±	-	-	++	+
Arabinose	+	-	-	++	±	++	±	+	+	+	++	+	+
Maltose	++	±	-	+	++	+	-	++	±	++	++	++	-
Mannose	±	±	+	++	++	++	±	++	+	+	++	++	-
Rhamnose	±	++	-	++	++	++	±	++	±	++	++	+	-
Sorbitol	+	+	±	++	+	++	++	++	±	±	±	-	-
Glucose	+	±	+	++	++	+	-	++	-	±	-	++	-
Galactose	++	±	-	++	++	++	±	±	-	++	++	+	+
Inositol	+	++	-	++	++	++	-	++	-	-	±	++	++
P.sodium	-	-	±	++	++	±	±	±	±	++	+	++	++
Su.sodium	-	+	+	++	+	++	+	+	-	++	++	±	-
Surbose	+	+	++	++	+	±	+	+	-	+	+	-	±
Xylitol	++	±	-	++	++	±	++	+	+	±	+	-	±
Fructose	++	+	+	++	+	+	+	++	++	++	+	+	+
Mannitol	+	±	+	++	++	+	++	++	++	+	++	+	±
Xylose	±	-	-	++	±	±	-	+	-	±	±	-	±

(-) : pas de croissance, (±) croissance faible, (+) croissance modérée, (++) croissance abondante.

2.2. Utilisation des sources d'azote

Les résultats de l'utilisation des sources d'azote sont mentionnés sur le (**Tableau 07**). La souche FRS2 est capable d'assimiler tous les acides aminés à l'exception de tryptophane. Alors que, les souches KES4 et FEK16 sont avérés capables d'assimiler 9 acides aminés sur

Résultats et discussion

les 13 sources testés, tandis que les souches T5 et BEK8 utilisent 8 et 5 sources d'azotes respectivement (**Figure 12**).

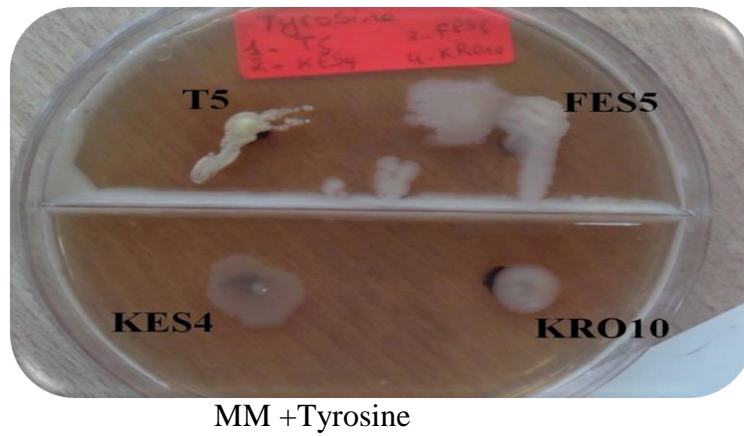


Figure 12 : Photographie de l'utilisation de source d'azote.

D'après les résultats mentionnés sur le tableau ci-dessous, ces souches bactériennes peuvent utiliser plusieurs sources d'azote, cette caractéristique montre la grande adaptation de ces bactéries et leurs capacités à coloniser plusieurs milieux différents.

Tableau 07 : L'utilisation des sources d'azote.

Souches / Sucres	BEK2	BEK8	FEK22	FRS2	FEK16	KEK10	KRO10	KES4	KRK1	KRK14	T5	T1	FES5
Asparagine	-	-	-	++	+	-	+	+	±	±	+	±	-
Tyrosine	-	-	-	++	+	++	+	+	±	++	+	±	++
Proline	+	++	+	++	++	++	++	++	++	-	-	-	-
Méthionine	±	±	-	++	+	-	-	-	±	+	-	±	-
Histidine	-	++	-	±	++	+	±	+	++	+	-	-	-

(-) : pas de croissance, (±) croissance faible, (+) croissance modérée, (++) croissance abondante.

Résultats et discussion

Tableau 07 (suite): L'utilisation des sources d'azote.

Souches \ Sucres	BEK2	BEK8	FEK22	FRS2	FEK16	KEK10	KRO10	KES4	KRK1	KRK14	T5	T1	FES5
Leucine	+	+	+	++	+	+	+	+	+	-	+	+	-
Alanine	+	±	±	++	+	-	±	+	±	±	+	+	-
Tryptophane	-	-	+	-	-	-	-	±	-	-	-	±	++
Arginine	+	+	-	++	++	+	+	++	++	-	++	+	-
Valine	+	++	-	++	±	-	±	±	++	±	+	++	-
Trypsine	++	±	++	++	++	±	±	++	++	±	+	-	++
Glycine	-	±	+	++	±	+	++	+	++	-	+	±	-
Thiamine	-	-	-	±	±	-	-	-	-	-	-	±	-

(-) : pas de croissance, (±) croissance faible, (+) croissance modérée, (++) croissance abondante.

2.3. La résistance des bactéries aux antibiotiques

Les résultats de la résistance aux antibiotiques représentés dans le (**Tableau 08**) indiquent que tous les souches sont sensibles à l'imipénème, la gentamycine et le chloromphynecol. Cependant, la majorité des souches sont résistantes au Pénicilline. Les isolats BEK2, FRS2 et KRO10 présentent le profil le plus sensible sur les 09 antibiotiques testés. Les plus grandes zones d'inhibition ont été enregistrées avec l'imipénème pour les souches KRO10, FEK16 et KES4 (**Figure 13**).

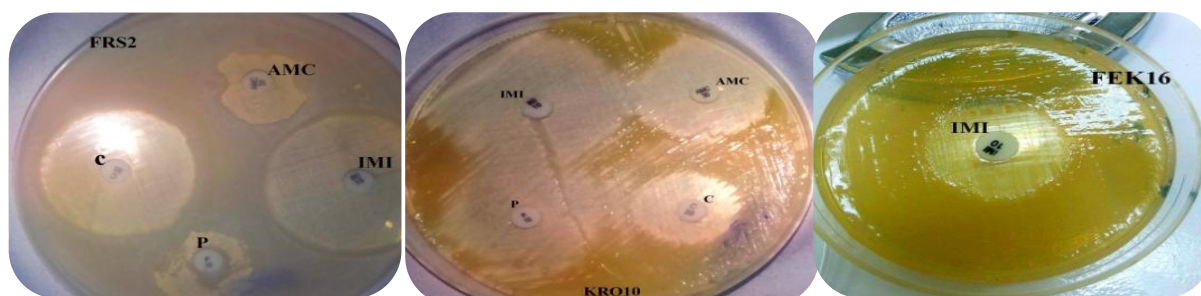


Figure 13: Photographies de la sensibilité et de la résistance des souches aux antibiotiques.

Résultats et discussion

La résistance des bactéries aux antibiotiques peut être naturelle, provenir de mutations, ou encore de transferts de gènes [40]. En général les bactéries rhizosphériques ne présentent pas des caractères de multi-résistances aux antibiotiques, cela s'explique par leurs habitats en voisinage des racines de plantes. En fait, grâce à la disponibilité des nutriments dans cette région, plusieurs types de microorganismes peuvent coexister, cependant, dans les conditions hostiles tels que les sols salins ou alcalins, la compétition entre les microorganismes augmente pour les nutriments et dans ce cas plusieurs types de microorganismes utilisent leurs métabolites secondaires, tels que les antibiotiques, pour inhiber les autres. De ce fait, la microflore des milieux hostiles est constituée principalement des bactéries sporulantes ou qui produisent plusieurs antibiotiques, tels que le genre *Streptomyces*.

Tableau 08 : La résistance des bactéries (PGPR) aux antibiotiques.

Antibiotiques Testés	Zone d'inhibition (mm)												
	BEK2	BEK8	FRS2	KRK1	KEK10	KRO10	FES5	FEK22	KES4	T5	T1	KRK14	FEK16
Erytromycine	30	0	27	0	14	29	24	0	18	0	0	30	0
Imipenème	34	27	32	31	30	41	33	40	40	25	22	22	23
Gentamycine	15	25	20	23	21	38	20	22	15	24	20	21	21
Pénicilline	40	0	21	0	0	31	0	0	31	0	0	0	0
Amoxicilline	24	0	20	0	10	30	24	31	28	0	0	18	0
Cefotaxime	29	20	25	17	20	30	0	9	0	20	20	0	15
Vancomycine	23	0	19	0	0	19	16	0	21	0	0	0	0
Chloromphynecol	35	20	33	21	30	21	23	38	30	24	18	11	13
Sulphaméthoxazole	28	0	29	0	20	31	0	0	31	0	11	0	0

2.4. Les activités de dégradation

Les résultats des activités de dégradation figurent dans le (**Tableau 09**).

Ces résultats montrent que tous les isolats sont révélés positifs pour la dégradation de l'adénine. L'amidon a été dégradé par les isolats KES4 et FRS2. Seulement la souche FRS2 a

Résultats et discussion

dégradé le tween 80. La majorité des isolats présentent une faible activité de dégradation envers la cellulose, de même aucun isolat n'a dégradé la ninhydrine, dix et sept isolats ont montré une capacité à dégrader respectivement la caséine et la gélatine (**Figure 14**).

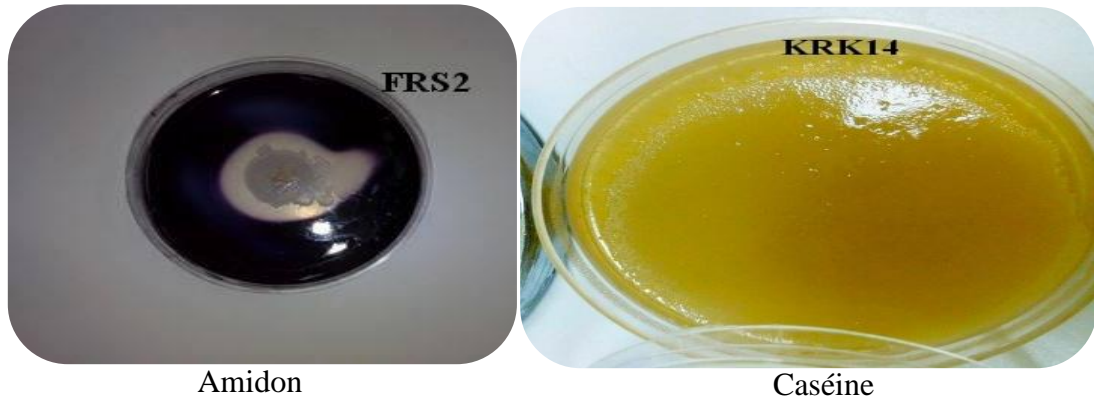


Figure 14 : Photographies des activités de dégradation.

Les PGPR présentent des activités de dégradation de divers composés (carbone, azote, protéine). Ces microorganismes vivant librement dans la rhizosphère peuvent également avoir un effet bénéfique sur la plante. Pour assurer sa croissance ou sa survie, une bactérie doit trouver dans son environnement de quoi satisfaire ses besoins nutritifs : substances énergétiques permettant à la cellule de réaliser la synthèse de ses constituants et substances élémentaires ou matériaux constitutifs de la cellule par exemple : L'adénine représente une source d'azote intéressante dans les milieux riches en matière organique. Elle constitue une source d'énergie en aérobiose et en anaérobiose. La complexité du catabolisme de l'adénine révèle l'intérêt de ce substrat pour les microorganismes. Elle est d'une grande importance physiologique puisqu'elle génère des substrats à haut niveau d'énergie, et constitue donc un mode d'élaboration d'ATP en anaérobiose [74].

Les bactéries étudiées présentent de faible activité de dégradation de polymères, cela peut être expliqué par la richesse de la rhizosphère en éléments nutritifs simples et facilement dégradables.

Résultats et discussion

Tableau 09 : Les activités de dégradation des bactéries (PGPR).

	BEK2	BEK8	FRS2	KRK1	KEK10	KRO10	FES5	FEK22	KES4	T5	T1	KRK14	FEK16
Adénine	+	++	++	++	++	++	+	+	++	++	+	+	++
Caséine	++	-	++	++	++	+	++	-	+	-	++	++	++
Gélatine	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-
Amidon	-	-	++	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Cellulose	±	±	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	±
Tween 80	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ninhydrine	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

(-) pas de croissance, (±) croissance faible, (+) croissance modérée, (++) croissance abondante.

2.5. La croissance en présence d'inhibiteurs chimiques et physiques

Dans le (**Tableau 10**) sont portés les résultats de la croissance des 13 souches en présence de différents inhibiteurs. Seuls les isolats BEK8, FRS2 et KRK14 ont pu résister à l'action inhibitrice du phénol (0,1% P/V). Les isolats BEK2, FEK16 et KRK14 leur croissance a été inhibée en présence de cristal violet.

Jusqu'au 6% du NaCl, la croissance n'a pas été affectée pour la plupart des isolats. Cependant, à une concentration de 7%, seulement la souche FES5 a montré une croissance. Au delà de 7% aucune croissance n'est enregistrée pour toutes les souches étudiées.

La croissance de la plupart des souches a été inhibée à pH 4 et 5. Une bonne croissance est observée à partir de pH 6 avec un optimum situé entre pH 7 et 9 ce qui explique que ces souches ont la capacité de coloniser les milieux neutre et alcalins (**Figure 15, 16, 17**).

Résultats et discussion

Tableau 10 : la croissance en présence d'inhibiteur chimique et physique.

Inhibiteurs chimiques	BEK2	BEK8	FRS2	KRK1	KEK10	KRO10	PES5	FEK22	KES4	T5	T1	KRK14	FEK16
NaCl 2%	++	+	++	++	+	+	+	-	+	+	++	++	-
NaCl 4%	++	-	++	±	±	+	++	-	-	++	-	±	-
NaCl 6%	++	++	++	±	±	++	++	+	++	±	±	++	+
NaCl 7%	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
NaCl 8%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NaCl 13%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Crystal violet	±	+	+	+	+	+	++	++	+	+	+	±	-
Phénol	-	++	++	-	-	±	-	-	±	-	-	+	-
pH=4	±	-	±	±	-	±	±	-	-	-	±	-	-
pH=5	±	-	+	±	-	±	±	-	-	-	±	±	-
pH=6	+	+	++	++	++	++	+	+	+	+	+	+	+
pH=7	+	+++	+++	+	+	±	++	+	+	+	+	++	++
pH=7,5	±	+	+++	+	+	+	+++	±	+	+	+	+	+
pH=8	+	+	+++	++	+	±	±	±	±	++	++	++	-
pH=9	+	+	+++	+	+	++	+++	+	±	++	++	+++	-

(-) pas de croissance, (±) croissance faible, (+) croissance modérée, (++) croissance abondante, (+++) croissance très abondante.

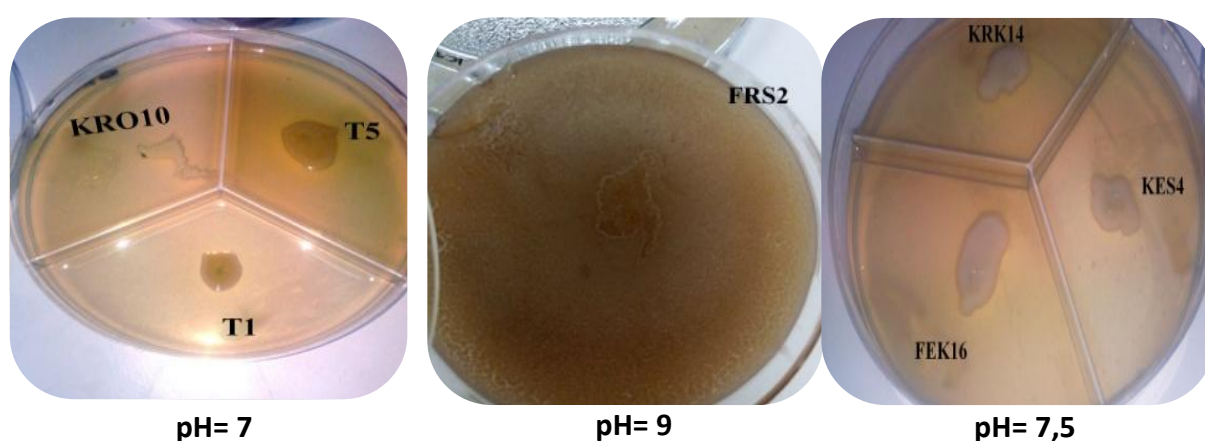


Figure 15 : Effet du pH sur l'inhibition de la croissance de certaines souches.

Résultats et discussion

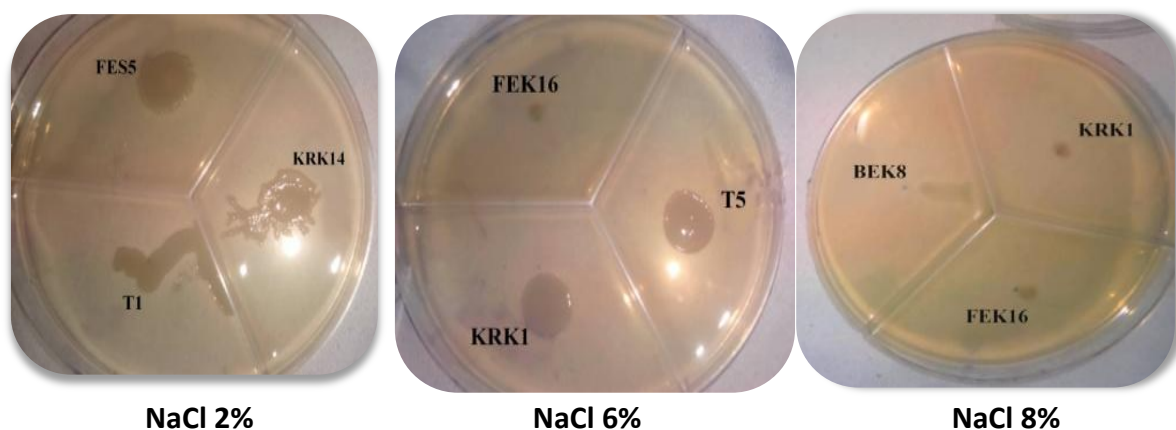


Figure 16 : Effet de différentes concentrations du NaCl sur la croissance de certaines souches

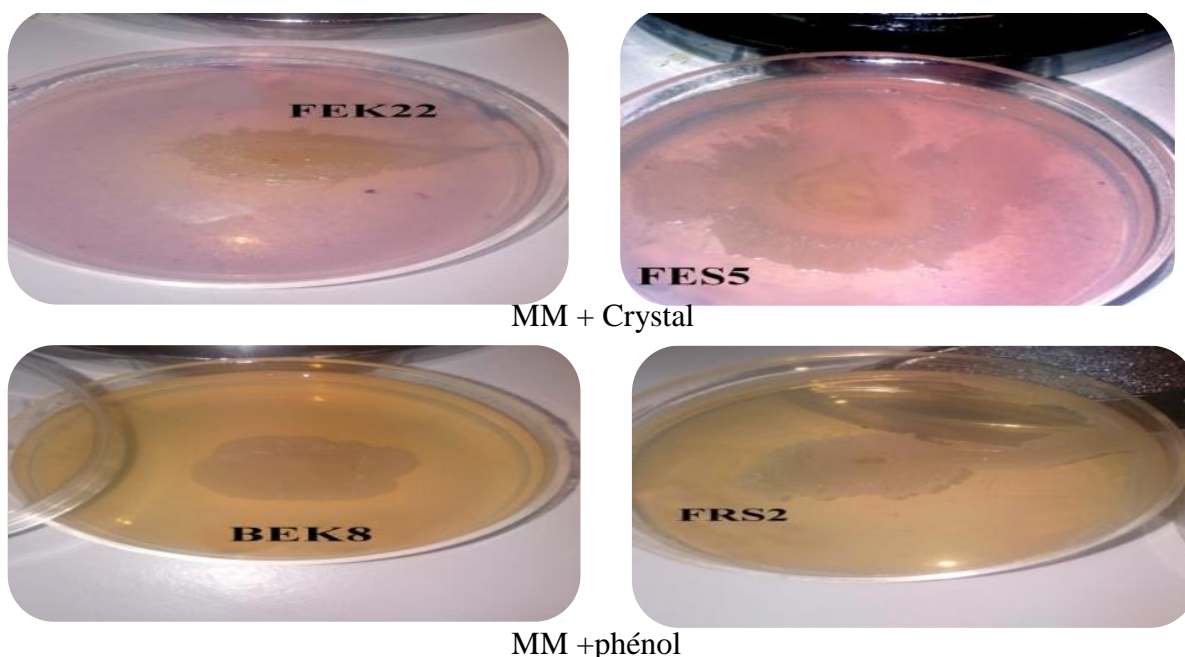


Figure 17 : photographie de la croissance de certaines souches en présence d'inhibiteurs chimiques.

La croissance en présence d'inhibiteurs chimique est un critère utilisé pour la classification et l'identification des rhizobactéries. Parmi ces paramètres la résistance à la présence du NaCl, cristal violet. Les PGPR peuvent prévenir les effets délétères du stress environnemental. Parmi les divers stress environnementaux, la salinité. Elle limite la croissance végétale et la productivité agricole dans de nombreuses régions du monde et en particulier dans les zones arides et semi arides, en provoquant une diminution de la photosynthèse, un déficit hydrique et un déséquilibre de la balance ionique. L'utilisation de PGPR comme inocula dans l'agriculture pour réduire le stress salin est la voie la plus prometteuse pour améliorer la production et le rendement des régions touchées par la salinité [40].

Résultats et discussion

L'alcalinité des sols est un problème qui existe principalement dans les sols calcaires, le problème de l'agriculture dans ce type de sol est essentiellement lié à la disponibilité des nutriments tels que le fer et le phosphate, en fait, plusieurs molécules en milieux alcalins change de forme et se transforme en molécules plus complexe, ce qui réduit leurs disponibilité aux plantes. Ici il apparait le rôle des PGPR qui peuvent solubiliser ces molécules et les rendre disponibles pour la plante. D'après nos résultats, les souches étudiées ont une grande capacité à tolérées des pH alcalins ce qui encourage à étudier leurs effets sur des sols de cette nature.

➤ La résistance des bactéries aux pesticides

Dans le (Tableau 11) sont portés les résultats de la sensibilité des souches aux différentes concentrations de pesticides. La majorité des souches ont pu résister les différents types de pesticides à une concentration de 1% (Figure 18). Plusieurs souches n'ont pas tolérées la concentration de 5% avec topic, tilt et tryp, cependant, une grande résistance est observée à cette concentration avec le pesticide sulfo.

Tableau 11 : la résistance des bactéries (PGPR) aux pesticides.

		BEK2	BEK8	FRS2	KRK1	KRK14	KRO10	KES4	KEK10	FEK22	T1	T5	FES5	FEK16
1%	Topic	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+
	Tilt	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
	Sulfo	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+
	Tryp	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+
5%	Topic	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+
	Tilt	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
	Sulfo	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
	Tryp	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+

(+) : résistance ; (-) : sensibilité.

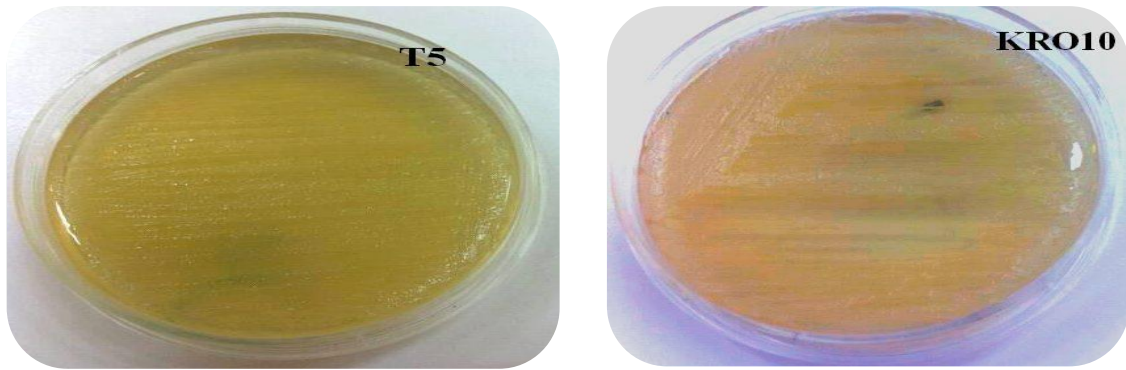


Figure 18 : Photographie de la résistance des souches aux pesticides.

L'amélioration de la production agricole nécessite la sélection préalable de souches bactériennes efficaces à effets PGPR, adaptées aux conditions environnementales stressantes (sol contaminé par les pesticides). La tolérance des micro-organismes aux pesticides est un processus complexe qui est réglementé tant au niveau physiologique / génétique des micro-organismes. Et par conséquent, les micro-organismes qui ont développé une résistance aux pesticides sont souvent capables de les biodégrader [75]. D'après nos résultats, quelques souches ont la capacité de tolérer des concentrations très élevées de pesticides ce qui nous oriente à étudier leurs capacité à dégrader ces molécules et/ou étudier leurs effets sur des sols contaminer aux pesticides.

2.6. Identification phénotypique de quelques souches

Par rapport aux résultats des tests morphologiques et préliminaires, seulement les bacilles à Gram négatif et à oxydase positif sont identifiés par l'utilisation de la galerie Api 20NE. Les résultats de la lecture de la galerie sont résumés dans le (**Tableau 12**) Selon ces résultats, deux souches appartenant au genre *Pseudomonas sp*, deux appartenant au genre *Aeromonas sp*. Il s'ajoute les genres *Chryseobacterium sp* et *Chryseomonas sp*. D'après la littérature plusieurs espèces de ces genres sont décrit très actives dans la rhizosphère par leurs effets bénéfiques multiples.

Résultats et discussion

Tableau 12 : Identification phénotypique de quelques souches à Gram négatif par galerie Api20NE.

	BEK8	FEK22	T5	KRK1	KRK14	BEK2	T1
NO ₃	-	-	-	+	-	+	+
TRP	-	-	-	-	+	-	-
GLU	-	-	-	-	+	-	-
ADH	+	-	+	+	+	-	+
URE	+	+	+	+	+	-	+
ESC	-	+	-	+	+	-	-
GEL	-	+	+	-	+	+	+
PMPG	-	+	-	+	+	-	+
GLU	+	+	-	+	+	+	+
ARA	-	-	+	+	+	+	+
MNE	-	+	+	+	+	-	+
MAN	-	+	+	+	+	+	+
NAG	-	-	+	+	+	-	+
MAL	-	-	+	-	+	+	+
GNT	+	+	+	+	+	+	+
CAP	+	-	+	+	+	-	-
ADI	-	-	-	-	-	-	-
MLT	+	+	+	+	+	-	-
CIT	+	-	+	+	+	-	-
PAC	+	-	-	-	+	+	-
OX	+	+	+	+	+	+	+
Identification	<i>Pseudomonas Putida</i>	<i>Chryseobacterium meningosepticum</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Chryseomonas luteola</i> 91%	<i>Aeromonas hydrophila/caviae</i>	<i>Aeromonas salmonicida</i> ssp <i>masoucida/achromogenes</i>	<i>Agrobacterium radiobacter</i>

A coté des résultats de la galerie API 20NE, d'autres tests de la galerie classique sont étudiés afin de mieux définir les caractéristiques métaboliques de ces souches (**Tableau 13**). D'après ces résultats, toutes les souches ne possèdent pas une uréase et ne produisent pas d'indole, cependant, les souches KRK1, KRK14, KEK10 et FES5 possèdent une tryptophane désaminase (TDA) qui transforme le tryptophane en indole pyruvique.

Seulement les souches FRS2, FES5 et KEK10 produisent l'acétoïne (**Figure 19**), alors que la fermentation de glucose en acides mixte est observée chez quatre souches (BEK8, KRK14, FEK16 et T5). Tous les isolats se sont capables de dégrader le citrate à l'exception des souches BEK8, KRK1 et KEK10.

Résultats et discussion

Tableau 13 : Caractéristiques métaboliques des souches d'après les tests de la galerie classique.

	VP	RM	IND	TRP	URE	CIT	ONPG	GLU	LAC / SAC	GAZ	H ₂ S	NO ₂	N ₂
BEK2	-	-	-	-	-	+	nd	-	+	-	-	+	-
BEK8	-	+	-	-	-	-	-	-	±	-	-	-	-
KRK1	-	-	-	+	-	-	+	-	±	-	-	+	-
KRK14	+	+	-	+	-	+	nd	±	+	-	-	-	-
KEK10	+	-	-	+	-	-	nd	-	-	-	-	+	-
KES4	-	-	-	-	-	+	nd	-	+	-	-	+	-
KRO10	-	-	-	-	-	+	nd	+	+	+	-	-	-
FEK16	-	+	-	-	-	+	-	-	±	-	-	-	-
FEK22	-	-	-	-	-	+	nd	-	±	-	-	-	-
FRS2	+	-	-	-	-	+	nd	±	+	-	-	+	-
FES5	+	-	-	+	-	+	-	±	+	+	-	-	-
T1	-	-	-	-	-	+	+	-	±	-	-	-	-
T5	-	+	-	-	-	+	-	-	±	-	-	-	-

nd: non déterminé

La β -galactosidase est recherchée seulement chez les bactéries qui ne dégradent pas le lactose (résultats présentés dans les parties précédentes) ou qui présentent une dégradation très faible, la présence de cette enzyme est observée en absence de dégradation de lactose pour la souche KRK1 et elle confirme le métabolisme de lactose pour la souche T1 vu que cette souche présente une faible croissance sur le milieu minimum+ lactose.

Toutes les souches ne présentent aucune production d'H₂S, ce qui se traduit par l'absence de précipité noire, en fait, l'origine de précipité noire est la réaction entre Le sulfure d'hydrogène et les ions Fe³⁺ du citrate de fer ce qui forme un précipité de sulfure de fer noire.

Seulement les souches KRO10 et FES5 présentent un dégagement de gaz lors de métabolisme des glucides.

Résultats et discussion

Les souches BEK2, KEK10, KRK1, KES4 et FRS2 ont montrés une réaction positive pour la présence du nitrate réductase (**Figure 19**). Dans le sol cette enzyme possède un rôle majeur dans le cycle d'azote, elle est produite principalement par les microorganismes et excréter aussi par les plantes pour transformer l'azote à une forme assimilable.

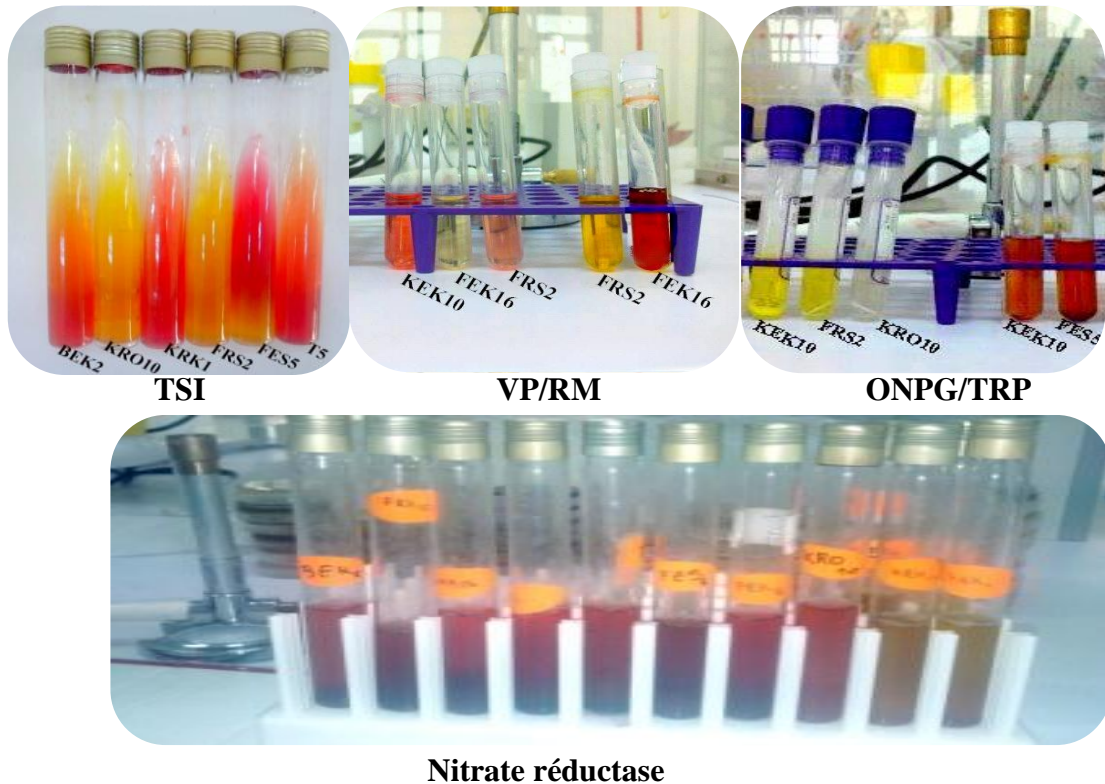


Figure 19 : Photographie de différents tests de la galerie

2.7. Analyse phylogénétique

Les résultats obtenus ont servi pour la construction de deux matrices binaires (bactéries à Gram positif et bactéries à Gram négatif) qui sont représentés dans (**l'annexe 02**).

Le calcul du coefficient de Jaccard de chaque matrice binaire pour chaque type de Gram a donné une matrice de similarité à partir de laquelle une matrice de distances a été calculée (**Tableaux 14, 15**).

Les arbres phénotypiques de chaque type de Gram sont motionnés dans les (**Figure 20, 21 et 22, 23**) Pour chaque matrice binaire deux algorithmes différents (UPGMA, NJ) sont utilisé pour élaborer les dendrogrammes.

Résultats et discussion

Tableau 14 : matrice de distance des bactéries à Gram négatif.

	BEK8	FEK22	T5	KRK1	KRK14	BEK2	T1
BEK8	0,000						
FEK22	0,519	0,000					
T5	0,429	0,557	0,000				
KRK1	0,448	0,537	0,371	0,000			
KRK14	0,469	0,550	0,373	0,507	0,000		
BEK2	0,526	0,596	0,538	0,567	0,597	0,000	
T1	0,475	0,561	0,323	0,362	0,463	0,411	0,000

D'après ce tableau, toutes les souches sont phénotypiquement différentes, les distances obtenues varient entre 0,3 et 0,5. La distance la plus petite est enregistrée entre les souches T5 et T1. Alors que la distance la plus grande est observée entre la souche KRK14 et BEK2.

Selon les deux dendrogrammes des bactéries à Gram négatif, aucune similarité de 100% n'est observée entre les souches. Les similarités les plus élevées sont observées à 0,5 pour le dendrogramme d'UPGMA et 0,17 sur le dendrogramme de NJ.

En ce fixant le degré de similarité à 0,50 sur le dendrogramme d'UPGMA, et 0,09 sur le dendrogramme de NJ, il est possible de voir trois groupes distincts : un porte la souche BEK2, le deuxième porte la souche FEK22 et le troisième porte le reste des souches.

Résultats et discussion

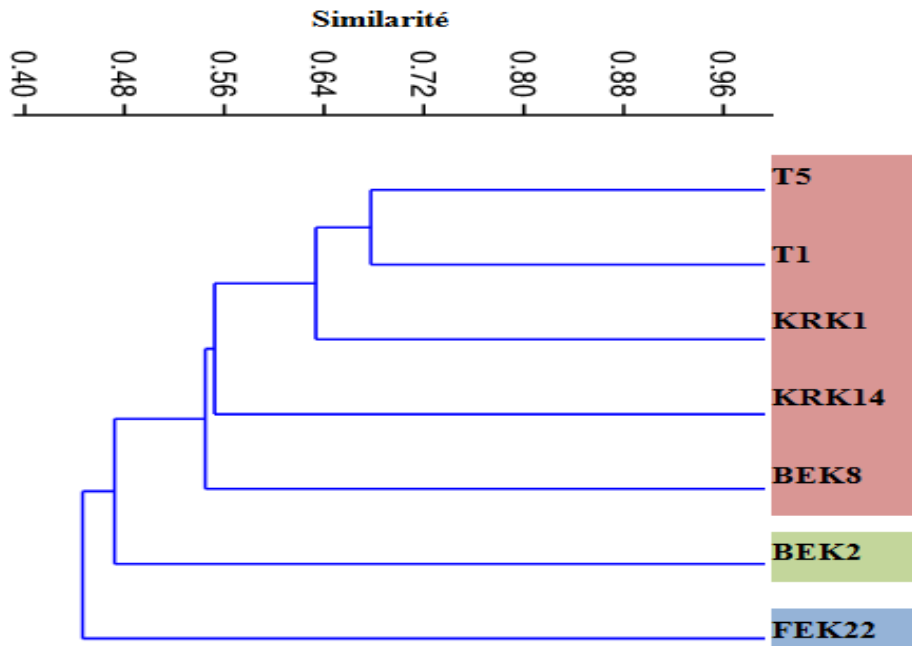


Figure 20: Dendrogramme de la taxonomie numérique des bactéries à Gram négatif construit selon la méthode UPGMA.

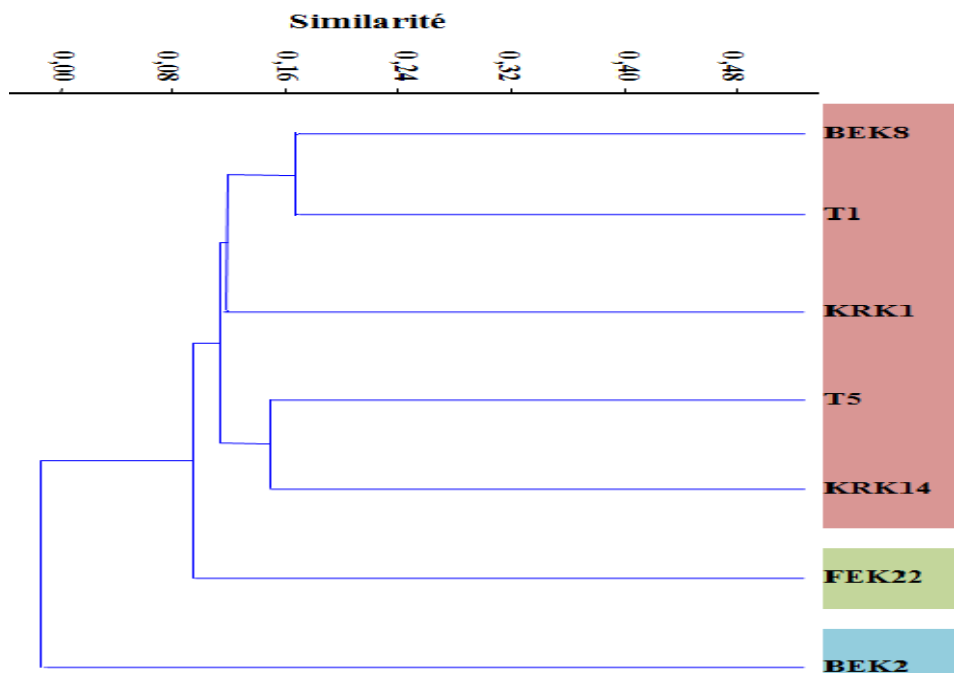


Figure 21: Dendrogramme de la taxonomie numérique des bactéries à Gram négatif construit selon la méthode NJ.

Résultats et discussion

Tableau 15: Matrice de distance des souches à Gram positif.

	KES4	KRO10	KEK10	FEK16	FES5	FRS2
KES4	0					
KRO10	0,46	0				
KEK10	0,40	0,57	0			
FEK16	0,40	0,51	0,50	0		
FES5	0,70	0,71	0,63	0,67	0	
FRS2	0,33	0,49	0,43	0,41	0,63	0

D'après le (**Tableau 15**), toutes les souches sont phénotypiquement différentes, les distances obtenues varient entre 0,3 et 0,7. La distance la plus petite est enregistrée entre les souches KES4 et FRS2. Alors que la distance la plus grande est observée entre la souche KES4 et FES5.

Selon les deux dendrogrammes des bactéries à Gram positif, aucune similarité de 100% n'est observée entre les souches. Les similarités les plus élevées sont observées à 0,65 pour le dendrogramme d'UPGMA et 0,15 sur le dendrogramme de NJ.

En ce fixant le degré de similarité à 0,50 sur le dendrogramme de UPGMA, il est possible de voir trois groupes distincts, un porte la souche FES5, le deuxième porte la souche KRO10 et le troisième porte le reste des souches.

A une similarité de 0,1 sur le dendrogramme de NJ, il est possible de voir trois groupes aussi : un porte la souche FRS2, le deuxième porte la souche KES4 et le troisième porte le reste des souches.

Résultats et discussion

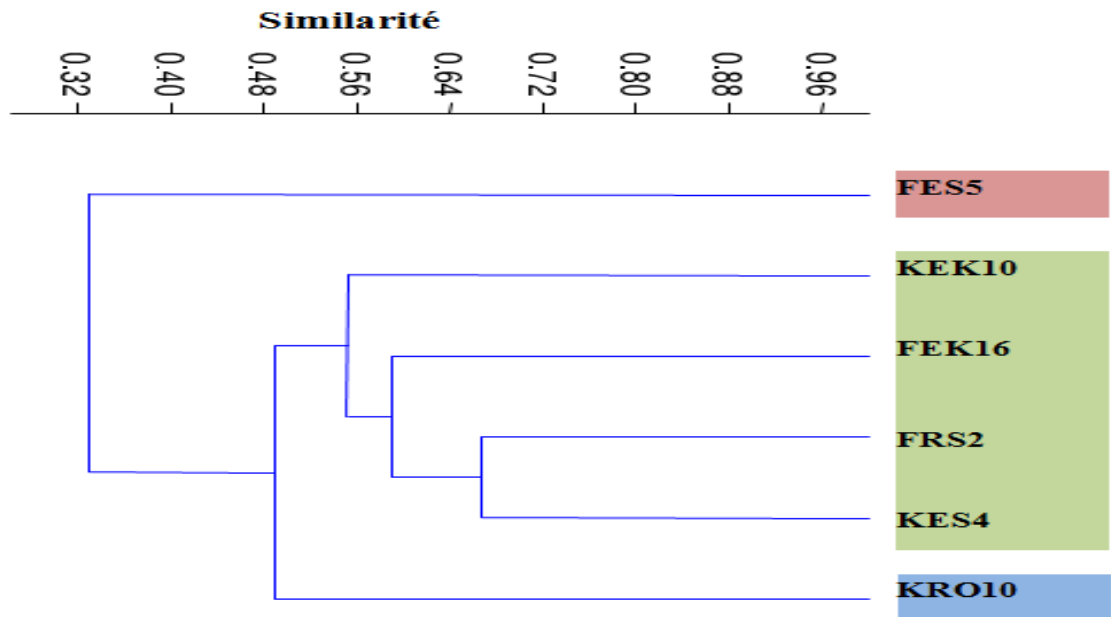


Figure 22: Dendrogramme de la taxonomie numérique des bactéries à Gram positif construit selon la méthode UPGMA.



Figure 23: Dendrogramme de la taxonomie numérique des bactéries à Gram positif construit selon la méthode NJ.

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 8 ماي 1945 قالمة
Université 8 Mai 1945 Guelma
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Sciences de la terre et de l'Univers



Mémoire En Vue de l'Obtention du Diplôme de Master

Domaine : Science de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité/Option : Santé, Eau et Environnement / Microbiologie de l'environnement.

Département : Ecologie et de génie de l'environnement

**Thème : Évaluation et taxonomie numérique des bactéries
promotrices des plantes isolées de rhizosphère du *Capsicum*
*annuum***

Présenté par :

Benhacene Zahra

Messiad Imane

Slimane Bouhrem Loubna

Devant le jury composé de :

Président : M^{me} Bedioui Souraya

M.A.A.

Université de Guelma

Examineur : M^{me} Boussadia M.Imen

M.A.A.

Université de Guelma

Encadreur : M^{lle} Khenaka Karima

M.A.A.

Université de Guelma

Juin 2016

Conclusion :

Le présent travail portant sur l'étude de quelques souches bactériennes isolées à partir de la rhizosphère de *Capsicum annuum* dans la région de Guelma. Ces souches sont connues par leurs capacités promotrices de la croissance de plantes à travers la production des auxines, des sidérophores et la solubilisation de phosphate inorganique. L'objectif de ce travail était l'étude morphologique et la détermination des caractéristiques métaboliques des souches et à la fin d'établir des matrices et des dendrogramme qui regroupent ces isolats selon leurs similitudes phénotypiques.

L'ensemble des tests morphologiques, physiologiques et biochimiques effectués, montrent que nos souches appartiennent aux plusieurs genres différents ainsi qu'ils peuvent utiliser divers sources de carbone, d'azote et présentent une capacité à dégrader des composés complexes comme la cellulose et l'adénine et la gélatine. Certaines souches PGPR peuvent croître en présence d'inhibiteurs chimiques tels que le phénol et le crystal violet, et aussi en présence de différentes concentrations en pesticides (tilt et topic). Les souches étudiées ne tolèrent pas des concentrations élevées du NaCl mais elles ont une bonne croissance sur des milieux basique.

L'utilisation de la galerie Api 20NE pour quelques souches a permet d'attribuer phénotypiquement les souches aux genres *Pseudomonas sp*, *Aeromonas sp*, *Agrobacterium sp* et *Chryseobacterium sp*.

L'établissement d'une taxonomie numérique sur l'ensemble des souches étudiées a permet les classés en groupes distincts. Dans ces groupes aucune similitude à 100% n'était observée. Selon le degré de similitude choisi, les bactéries à Gram négatif et à Gram positif sont regroupées en trois groupes différents.

L'ensemble des tests effectués et les résultats obtenus révèlent une grande importance à ces souches et ouvre plusieurs perspectives pour continuer.

Dans le but de progresser dans cette étude il serait souhaitable dans les prochains travaux :

- ✓ d'élucider les mécanismes par lesquelles les PGPR stimule la croissance et protège les plantes.
- ✓ D'étudier la capacité des souches à dégrader les pesticides et à développer la croissance des plantes dans des régions contaminées
- ✓ D'étudier la capacité de ces souches à améliorer la croissance des plantes dans des sols basiques.

- ✓ D'étudier l'effet des souches directement sur les plantes
- ✓ D'identifier ces souches par des méthodes de biologie moléculaire

Référence

- [1]. **Kerbab Souhila.** (2010). Les actinomycètes d'un sol salé: rôle des osmoprotecteurs naturels. Université Ferhat Abbas de Sétif. 14p.
- [2]. **Campbell R. and Greaves M. P. (1990).** Anatomy and community structure of the rhizosphere. In the rhizosphere. Lynch I. M. (Eds). Wiley Series in Ecological and Applied Microbiology. 11-34p.
- [3]. **N.belaid, M.cherifi, L.tebani.** (2013). Etude de la production de l'acide-3-indole acétique et de l'activité antifongique d'une souche de *Pseudomonas fluorescens* isolée à partir de la rhizosphère du blé de la wilaya de Guelma, 1p.
- [4]. **Bloemberg, G. and Lugtenberg, B.** (2001). Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by *rhizobacteria*. Cur. Opin. Plant Biol. 4: 343-350.
- [5]. **B.sasirekha,S.Shivakumar,S.B.Sullia.**(2012).Statistical optimization for improved indol-3-acetic(AIA) production by *Pseudomonas aeruginosa* and demonstration of enhanced plant growth promotion. Journal of soil science and plant nutrition, 12(4) 863-865p.
- [6]. **N.Khakipour, K. Khvazi, H. Mojallali, E. Pazira, H. Asadirahmani.** (2008). production of auxin hormone by *Fluorescent pseudomonas*. American-Eurasian Journal Agriculture and Environment Science(6) 687-688p.
- [7]. **Philippe, Hinsinger.** «Les racines au cœur du fonctionnement de la rhizosphère », In *Montpellier SUPAgro - CIRAD - Inra - IrDI*, n°101, mai-juin2010, 17.
- [8]. **Mouas Bourbia, Sophia.** (2012). Biodisponibilité du potassium dans la rhizosphère de *Olea europea L.* Université Mouloud Mammeri Tizi-Ouzou. 19-20p.
- [9]. **Schroder P, Hartmann A.** (2003). Global Soils: New Developments in Rhizosphere Research. J. Soils & Sediments 3 (4). 227p.
- [11]. **Lynch JM., Whipps JM.** 1990. Substrate flow in the rhizosphere. *Plant and Soil*/129, 1-10p.

[12]. **Hinsinger P, Plassard C, Jaillard J.** 2006. Rhizosphère : A new frontier for soil biogeochemistry. *Journal of Geochemical relevation-Plant and soil* 321, 117-152p.

[13]. **Maalem Ahlem, Sansri Dalal.** (2014). Activité anti-phytopathogènes de quelques souches rhizosphériques appartenant aux groupes des actinomycètes filamenteux et des *Pseudomonas spp fluorescents*. Université 8 Mai 1945 Guelma. 22p.

[14]. **Grayston S.J., Vanghan D., Jones D.**(1996). Rhizosphere carbon flow in trees, in comparison with annual plants: the importance of root exudation and its impact on microbial activity and nutrient availability. *Applied Soil Ecology* 5, 29-56p.

[15]. **J.M.Gobat, M. Aragno, W. Matthez.** (2003). Le sol vivant: bases de pédologie biologique des sols. Presses Polytechniques et Universitaires, Lausan. 5-6p.

[17]. **Hinsinger P, Gobran G.R, Gregory P.J, Wenzel W.** 2005. Rhizosphere geometry and heterogeneity arising from root-mediated physical and chemical processes. *New phytologist* 168, 293-303p.

[18]. **Maalem Ahlem, Sansri Dalal.** (2014). Activité anti-phytopathogènes de quelques souches rhizosphériques appartenant aux groupes des actinomycètes filamenteux et des *Pseudomonas spp fluorescents*. Université 8 Mai 1945 Guelma. 23-24p.

[19]. **Rovira A.D.** 1969. Plant root exudate. *Botany Review* 35, 35-57p.

[20]. **M.C.Girard, C.Water.** 2005. Sol et environnements. Junod, Paris, 306-317p.

[22]. **Braghta Hamida, Merabet Hadjer.** (2014). Thème: Etude de la capacité de quelques isolats rhizosphériques à produire des molécules bioactives contre le phytopathogène *Fusarium oxysporum*. Université Guelma. 20,24p.

[23]. **S.Meyer, C.Reeb, R.Bosdeveix.** Botanique: biologie et physiologie végétales. 2^{em} Edition Maloine, Paris 328-334p.

[28]. **Coineau Yves.** (1995). Le sol: un milieu de vie. Fondation pour la nature et l'homme Repères pour l'éducation à l'environnement. 2, 02p.

[29]. **Curl E. A. and Truelove B.** (1986). The rhizosphere, Advanced series in agriculture sciences. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 288p.

[30]. **Dommergues Y. and Mangenot F.** (1970). Écologie Microbienne du sol. Masson, Paris.

[31]. **Gagné S., Antoun H. and Richard C.** (1985). Inhibition of phytopathogenic fungi by bacteria from soils and legume rhizosphere. Can. J. Microbiol. 31(9), 856-860p.

[32]. Fiche technique de la flore.

[33]. **Curl E. A. and Truelove B.** (1986). The rhizosphere, Advanced series in agriculture sciences. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 288p.

[34]. **Z.Bendaira, K.Koucemina, K.Khanaka, K.Bouchair, M.Menad.** 2008. Etude in vitro de l'impact de l'antimoine et du chrome sur la rhizoflore bactérienne de *Lygeum Spartum* et d *Hedysarum pallidum*, isolement et identification de souches résistantes à ces métaux. Université Mentouri Constantine, 3-8p.

[35]. **B.Sofiane.** (1998).isolement à partir de la rhizosphère des conifères des bacteries et d'actinomycètes antagonistes aux champignons phytopathogènes. Université Laval, 01p.

[36]. **Doumbou C.L., Salove M.K., Crawford D.L. and Beaulieu C.** (2001). Actinomycetes, promising tools to control plant diseases and to promote plant growth. Phytoprotection. 82, 85-102p.

[37]. **Doumbou C.L., Salove M.K., Crawford D.L. and Beaulieu C.** (2001). Actinomycetes, promising tools to control plant diseases and to promote plant growth. Phytoprotection. 82, 102-111p.

[39]. **Roger Corbaz.** (1990).Principe de phytopathologie et la lutte contre les maladies des plantes. Presses polytechniques et universitaires romandes. Suisse. ISBN 2-88074-201-3 pages 10-13.

- [40]. **A.Boulanger.** (2009). Analyse d un nouveau système CUT impliqué dans l acquisition et l'utilisation du N-acétylglucosamine par *Xanthomonas campestris pathovar campestris*. Université de Toulouse, 2-4p.
- [41]. **E.Duhoux,M. Nicole.** 2004. biologie végétale: Associations et interactions chez les plantes.Dundo, Paris, 6-56p.
- [42]. **A.Besserer.**2008. Etude des mécanismes d'action des strigolactones sur les champignons endomycorhiziens à arbuscules. Université de Toulouse-Paul Sabotier, 15-16 p.
- [44]. **S.Saddiki.Avril** 1999.Utilisation du *Bradyrhizobium Japonicum* comme rhizobactéries favorisant la croissance des plantes chez le maïs. la faculté des Etudes Supérieures de l'Université Laval, 3p.
- [46]. **ANDRIA MBOLOLONA T.** (2010). Etude bibliographiques et chimiques des métabolites secondaires des actinomycètes telluriques cas du forêt d'ANKAFOBE. Mémoire de recherche pour l'obtention du Diplome d'études approfondies de biochimie. Université d'ANTANANARIVO, Madagascar : 5p.
- [47]. **PERRY J.J., STALEY J.T, et LORY S,** (2004). Microbiologie. Edition Dunod.
- [48]. **TORTORA G.J., FUNKE B.R. et CASE C.L.** (2012). Introduction à la microbiologie. Edition de Renouveau pédagogique, Québec: 152-408p.
- [49]. **Stackebrandt, E., Rainey, F.A., Ward-Rainey, N.L.** (1997). Proposal for a new hierarchic classification system, *Actinobacteria classis nov.*Int J Syst Evol Microbiol, 47(2): 479–491.
- [50]. **BOUCHEFFA. K.**2011. Criblage de souches d'actinomycètes productrices d'antifongiques non-polyéniques: Identification des souches productrices et Essai de caractérisation des antifongiques produits. Université Abderrahmane Mira Bejaia. 06p.
- [51]. **Kalakoutskii,agre.** (1976) .comparative aspects of development and differentiation in actinomycetes. Bacteriol. Rev.40 (2),469-524p.

- [52]. **Lacey, J.** (1997). Actinomycètes in composts. *Ann. Agr. Env. Med.* 4, 113-121p.
- [53]. **Mariat, F., Sebald M.** (1990). Les actinomycètes. Dans : Bactériologie médicale. L. Minor. Edition Médecine-Science. Flammarion. France.
- [54]. **Williams, S. T., M. Goodfellow, G. Anderson, E. M. H. Wellington, P. H. A. Sneath, M. J. Sackin.** (1983). Numerical classification of *Streptomyces* and related genera. *J. Gen. Microbiol.* 129: 1743-1813.
- [56]. **Silini Soumaya.** (2011). Contribution à l'étude de la biodegradation de la méthyléthylcétone en reacteur batch par les actinomycètes isolés à partir des boues activées de la station d'épuration d'El-Atmania. Université: Mentouri Constantine. 19, 20, 21, 22, 23p.
- [57]. **LECHEVALIER A.H.** (1981). Introduction to the order Actinomycetales, (volume 2). Springer-Verlag Edition Berlin : 1915-1922.
- [58]. **Glick B, R, Patten C.L, Holgin G, Penrose D, M.** (1999). Biochemical and genetic mechanisms used by plant growth promoting bacteria. London: Imperial College Press, 267p.
- [59]. **Moore, E. R. B., Tindall, B. J., Martins Dos Santos, V. A. P., Pieper, D. H. Ramos, J. L. & Palleroni, N. J.** (2006). Nonmedical: *Pseudomonas*, In M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K. H. Schleifer, et E. Stackebrandt (ed.), Prokaryotes, Springer, USA. P. 646-703p.
- [61]. **Mezaache, S.** (2012). Localisation des déterminants de la suppression de quelques souches de *Pseudomonas* isolées de la rhizosphère de la pomme de terre. Université Ferhat Abbas Sétif. 141: 3-26p.
- [62]. **Singleton, P., & Sainsbury, D.** (2006). Dictionary of Microbiology and molecular Biology, Third Edition Paul Singleton and Diana Sainsbury. John Wiley and Sons Ltd. ISBN. P: 637-638.

[63]. **Tsuji, A., Kaneko, Y., Takahashi, K., Ogawa, M., & Goto, S.** (1982). The effects of the perature and pH on the growth of eight enteric and nine glucose non-ferenting species of growth negative rods. (1): 15-24p.

[64]. **Schroth, M.N. and Hancock, J.G.** (1981). Selected topics in biological control. Annu. Rev. Microbiol. 35:453-476p.

[65]. **Coineau Yves.** (1995).Le sol: un milieu de vie. Fondation pour la nature et l'homme Repères pour l'éducation à l'environnement.2, 02p.

[70]. **P.darouin.** (1996). Caractérisation phénotypique et génotypique et étude des mécanismes d'adaptation aux basses températures des souches de *Rhizobium* isolées de *Lathpus japonicus et Lathpus pratensis*. Faculté des Sciences de l'Agriculture et de l'Alimentation Université Laval Québec.

[71]. **Chabot R,Antoun H, KloepperJ, W, and Beauchamp C.J.** (1996) .Root colonization of maize and lecttuce by bioluminescent *Rhizobium leguminosarum bivar phaseoli* .Appl. Environ. Microbiol.62: 2767-2772p.

[77]. **Madeline Asdreubal.** (2005).Croissance et développement des plantes cultivées. Educagri edi.France.ISBN 978-2-84444-405-9.24-28p.

[78]. **R.Heller. R. Esnault,C.Lance.** (2002). Physiologie végétale.Dunod.Paris.ISBN 2100487116.65 à 78p.

[79]. **B.William,G.Hopkins.**(2003).Physiologie vegetale.DeBoeck.ISBN 2-74450089-5.316-435p.

[80]. **JeanPelmont.** Bacteries et environnement.EDP.ISBN 2.7061.0502.8. 146-542p.

[83]. **S.KAOUACHE.** (2010). Evaluation et taxonomie numérique de la flore *Listeria spp.* Dans un environnement d'élevage bovin. Université Mentouri Constantine Faculté des sciences de la nature et de la vie Département de biochimie et microbiologie, 20p.

[84]. **Réne- Chaume.R.** (1975). Les méthodes de taxonomie numérique, Boissiera .24: 369-381.

[86]. **ANDERBERG (M. R.).** (1973). Cluster Analysis for Applications: 1-390 New York, San Francisco, London.

[88]. **Luchetta P., Maurel M. C., Higuët D. et al.** (2005). Evolution moléculaire.Dunod. Paris. ISBN : 2 10 006880 6. 330 p.

[89]. **Lecointre G. et Le Guya der H.** (2001). Classification phylogénétique du vivant. Belin. Paris. ISBN : 2- 7011- 4273- 3. 537 p.

[93]. Fiche technique.

[95]. **S. Mezaache.** (2012). Localisation des déterminants de la suppression de quelques souches de *Pseudomonas* isolées de la rhizosphère de la pomme de terre. Université Ferhat ABBAS Sétif, 94p.

[98].

[99].

Les sites Web

[10]. http://www.biophyt.ch/documents/cours_paris.pdf (consultation le 02/05/2016 14: 02).

[16]. <http://www.nature.com/nrmicro/journal/v11/n11/full/nrmicro3109.html>. (Consultation le 12/05/2016 20: 22).

[21]. [http://fr.wikipedia.org/w/index.php?title=Rhizosphère &oldid=111234464](http://fr.wikipedia.org/w/index.php?title=Rhizosphère&oldid=111234464) (consultation le 18/04/2016 15: 30).

[24].<http://www.doc-developpement-durable.org/file/Fertilisation-des-Terres-et-des-Sols/amelioration-sols/1-UC1-amelioration-fertilite-sols-S12A2C>. (Consulter le 23/04/2016 22: 23).

[25]. <http://www.suds-en-ligne.ird.fr/agriculture/les-defis-de-lagriculture-familiale/preserver-lenvironnement/reduire-le-recours-aux-engrais-chimiques/> (Consulter le 30/04/2016 23: 00).

[26]. <http://cgdc3.igmors.u-psud.fr/microbiologie/symbioses.htm>.(Consultation le 29/04/2016 16: 32).

[27]. <http://www.cvc.u-psud.fr/spip.php?>. (Consultation le 29/04/2016 20: 30).

- [38]. [http://www.inra.fr/Chercheurs-etudiants/Biologie-vegetale/Tous-les-dossiers/Sentir-bouger-communiquer-les-plantes-aussi/Communication-externe-les-liens-plantes-champignons/\(key\)/5](http://www.inra.fr/Chercheurs-etudiants/Biologie-vegetale/Tous-les-dossiers/Sentir-bouger-communiquer-les-plantes-aussi/Communication-externe-les-liens-plantes-champignons/(key)/5) (consultation le 01/05/2016 20: 20).
- [43]. www.nature.com (consultation le 10/05/2016 22: 22).
- [45]. <http://catalogue.bnf.fr/ark:/12148/cb15097536s>.(consultation le: 27/4/2016 à 20:10).
- [55]. <http://catalogue.bnf.fr/ark:/12148/cb15097536s>.(consultation le: 3/4/2015 à 16:45).
- [60]. <http://microbiologiefa.blogspot.com/> (Consultation le 10/05/2016 22: 12).
- [66]. <http://theses.ulaval.ca/archimede/fichiers/22689/ch02.html#d0e1004>. (Consultation le : 02/05/2016 19: 38).
- [67]. <https://archive-ouverte.unige.ch/unige:17795>. (Consultation le : 02/05/2016 19: 50).
- [68]. <http://www.interet-general.info/spip.php> (consultation le 10/05/2016 21: 22).
- [69]. http://www.memoireonline.com/05/12/5818/m_Effet-de-linoculation-avec-bradyrhizobium-japonicum-et-de-lapport-de-phosphore-sur-la-produc8.html. (Consultation : 02/05/2016 18:00).
- [72]. <http://www.bgb.wifeo.com/bacillus.php>. (Consultation le 02/05/2016 17: 22).
- [73]. <http://fdanieau.free.fr/cours/bts/A1/microbiologie/TP/Gram+GenreBacillus.pdf> (Consultation le 02/05/2016 17 :26).
- [74]. <http://processpropre.fr/Archives-article/Fiche/905/Un-agent-nettoyant-nomme-Bacillus-%2521> (consultation le 10/05/2016 21 :35).
- [75]. <https://fr.wikipedia.org/wiki/Bacillus> (Consultation le 02/05/2016 17:27).
- [76]. www.ecologiemiobiennelyon.fr (consultation le 10/05/2016 22 : 25)
- [81]. <http://www.inrp.fr/Access/biotic/morpho/html/cytokinines.htm.n>. (consultaion le 04/05/2016 20: 30).
- [82]. <http://anne.decoستر.free.fr/btelechar/bpoly/Taxono01.pdf> (consultation le 10/05/2016 22: 31).
- [85]. <http://microbia.free.fr/CoursABM/ABM6.%20Taxonomie%20bacterienne.pdf> (Consultation le 10/05/2016 22: 35).

[87]. http://www.ac-nice.fr/svt/prepagreg/IMG/pdf/Evolution_2011_a.pdf (Consultation le 10/05/2016 21: 40).

[90]. <https://fr.wikipedia.org/wiki/Parcimonie> (Consultation le 10/05/2016 12: 38).

[91]. <https://fr.wikipedia.org/wiki/Vraisemblance>. (Consultation le 10/05/2016 13:02).

[94]. https://fr.wikipedia.org/wiki/Source_de_carbone.

[96]. <file:///C:/Users/Seven/Downloads/Vol43-12-Plassard.pdf>.

[97]. <http://www.larecherche.fr/savoirs/dossier/visite-guide-au-coeur-arsenal-bacterien-01-11-1998-77615>.

Annexe 1 : La solution de 0.5 Mac Farland

L'étalon 0.5 Mac Farland est préparé en versant 0.5ml d'une solution de BaCl₂ dihydrate a 1%(10g/l), dans une éprouvette de 100ml compléter a 100ml avec du H₂SO₄ a 1%(10ml/l) ainsi préparé, il doit avoir une DO de 0.08 à 0.11 lue à 625nm.

Annexe01: Milieux de culture (g/l)

Milieu minimum

(NH) ₂ SO ₂	2,64g
KH ₂ PO ₄	2,38g
K ₂ HPO ₄	5,65g
MgSO ₄ .7H ₂ O	1g
Solution saline2	1ml
Agar	20g

pH: 6,8-7,0

Bouillon nutritif à 0.1% d'KNO₃

Peptone	10g
Extrait de levure	5g
NaCl	5g

pH: 7,2

mannitol-mobilité

Peptone pancréatique de viande.....	20g
Agar-agar.....	4,5g
Mannitol.....	20g
Nitrate de potassium.....	1,5g
Rouge de phénol solution à 1%.....	2,5ml

pH :7,6

Solution saline

FeSO ₄ .7H ₂ O.....	1,1g/l
CuSO ₄ .5H ₂ O.....	6,4g/l
ZnSO ₄ .7H ₂ O	1,5g/l
MnCl ₂ .4H ₂ O.....	7,9g/l

Sierra

Tryptone	3g
Extrait de levure	5g
Glucose	5g
Tween	1%
CaCl ₂	0,01%
Agar	20g

pH: 7

Solution iodine (Gram)

KI	2g
I ₂	1g
Eau distillée.....	300m

CMC (CarboxyMéthylCellulose)-agar

Agar	20g
Extrait de levure	0,2g
Glycérol	2ml
CMC (Carboxy Méthyl Cellulose).....	10g

(Ajouter le CMC progressivement sous agitation et à une température d'environ 60°C)

pH :7,3

Annexe 2 : Tableau de lecture de la galerie API 20NE.

TESTS	COMPOSANTS ACTIFS	QTE (mg/)	REACTIONS/ENZYMES	RESULTATS	
				NEGA	POSITIF
NO3	potassium nitrate	0,136	réduction des Nitrates en nitrites	incolore	NIT 1 + NIT 2 / 5 min rose-rouge
			réduction des Nitrates en azote	rose	Zn / 5 min incolore
TRP	L-tryptophane	0,2	formation d'indole (TRYPTOPHANE)	incolore vert pâle	JAMES / immédiat rose
GLU	D-glucose	1,92	fermentation (GLUCOSE)	bleu à	jaune
ADH	L-arginine	1,92	Arginine DiHydrolase	jaune	orange / rose / rouge
URE	urée	0,76	UREase	jaune	orange / rose / rouge
ESC	esculine citrate de fer	0,56 0,072	hydrolyse (B-glucosidase) (ESCUline)	jaune	gris / marron / noir
GEL	gélatine (origine bovine)	0,6	hydrolyse (protéase) (GELatine)	pas de diffusion du	diffusion du pigment noir
PNPG	4-nitrophényl-βD-galactopyranoside	0,22	B-galactosidase (Para-NitroPhényl-βD-Galactopyranosidase)	incolore	jaune
GLU	D-glucose	1,56	assimilation (glucose)	transparence	trouble
ARA	L-arabinose	1,4	assimilation (arabinose)	transparence	trouble
MNE	D-mannose	1,4	assimilation (mannose)	transparence	trouble
MAN	D-mannitol	1,36	assimilation (mannitol)	transparence	trouble
NAG	N-acétyl glucosamine	1,28	assimilation (N-acétyl-glucosamine)	transparence	trouble
MAN	D-maltose	1,4	assimilation (MALtose)	transparence	trouble
GNT	potassium gluconate	1,84 0,78	assimilation (potassium GlucoNaTe)	transparence	trouble
CAP	acide caprique	0,78	assimilation (acide CAPrique)	transparence	trouble
ADI	acide adipique	1,12	assimilation (acide ADIrique)	transparence	trouble
MLT	acide malique	1,56	assimilation (MaLaTe)	transparence	trouble
CIT	trisodium citrate	2,28	assimilation (trisodium CITrate)	transparence	trouble
PAC	acide phényl acétique	0,8	assimilation (acide Phényl ACétique)	transparence	trouble
OX	(voir notice du test oxydase)	-	cytochrome-oxydase	(voir notice du test oxydase)	

Annexe 3 :

Annexe 2 : Tableau de la matrice binaire des caractères étudiés des bactéries Gram positif.

Caractères		Caractères morphologiques				Source de carbone																Source d'azote														
		Forme	Mobilité	Oxydase	Catalase	Arabinose	Fructose	Galactose	Glucose	Inositol	Lactose	Maltose	Mannitol	Mannose	Rhamnose	Saccharose	Sorbitol	Surbose	Xylose	Xylitol	P. sodium	Su. sodium	Arginine	Proline	Thiamine	Tyrosine	Alanine	Histidine	Glycine	Méthionine	Valine	Leucine	Tryptophane	Trypsine	Asparagine	
Souches																																				
KES4	B1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1		
KRO10	B2	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	
KEK10	B3	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0	0		
FEK16	B4	0	0	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	
FES5	B5	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	
FRS2	B6	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1

Annexe 2 : tableau de la matrice binaire des caractères étudiés des bactéries Gram positif.

SOUCHE		Auxine	Sidérophore	Phosphte	Caractères biochimiques									
					VP	RM	NIT	H2S	CO2	ONPG	URE	TRP	CIT	IND
KES4	B1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0
KRO10	B2	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0
KEK10	B3	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0
FEK16	B4	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0
FES5	B5	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0
FRS2	B6	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0

Annexe 2 : tableau de la matrice binaire des caractères étudiés des bactéries Gram négatif.

Caractères souches	Caractères MG				Source de carbone														Source d'azote																	
	Forme	Mobilité	Oxydase	Catalase	Arabinose	Fructose	galactose	Glucose	inositol	lactose	Maltose	mannitol	mannose	rhamnose	saccharose	sorbitol	surbose	xylose	xylitol	P de sodium	Su de sodium	Arginine	proline	thiamine	tyrosine	alanine	nynhydrine	histidine	glycine	méthionine	valine	leucine	tryptophane	trypsine	asparagine	
BEK8	1	1	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0
FEK22	1	1	1	1	0	1	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0
T5	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1	
KRK1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	0	
KRK14	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	
BEK2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	
T1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	

Annexe 2 (suite) : tableau de la matrice binaire des caractères étudiés des bactéries à Gram négatif

Caractères Souches	Activité de Dégradation						Effet d'inhibiteur chimique														Effet d'inhibiteur physique					Résistance aux antibiotiques													
	caséine 1%	tween 80%	Cellulose	Adénine 0,1%	Amidon	Gélatine 0,4%	Phénol	Crystal violet	Tilt 1%	Topik 1%	Trypsine 1%	Sulfo 1%	Tilt 5%	Topik 5%	Trypsine 5%	Sulfo 5%	Nacl 2%	Nacl 4%	Nacl 6%	Nacl 7%	Nacl 8%	Nacl 13%	pH 4	pH 5	pH 6	pH7	pH 7,5	pH8	pH9	érythromycine	gentamicine	imipenème	Amoxiciline	Pénicilline	Chloromphyne	Cefotaxime	Vancomycine	SXT	
BEK8	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1
FEK22	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1
T5	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	
KRK1	1	0	1	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	
KRK14	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	1	1	1	
BEK2	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
T1	1	0	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0	

Annexe 2 (suite): Tableau de la matrice binaire des caractères étudiés des bactéries Gram négatif.

SOUCHE	Auxine	Sidérophore	Phosphite	Caractères biochimiques																	
				VP	RM	NIT	H ₂ S	CO ₂	ONPG	URE	TRP	CIT	ADH	ESC	NAG	GNT	CAP	ADI	PAC	IND	
BEK8	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	1	1	0	1	0
FEK22	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0
T5	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0
KRK1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0
KRK14	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0
BEK2	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0
T1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0

Résumé

Le présent travail portant sur l'étude de quelques souches bactériennes isolées à partir de la rhizosphère de *Capsicum annuum* dans la région de Guelma. L'objectif de ce travail était l'étude morphologique, la détermination des caractéristiques métaboliques des souches et une évaluation de la similitude phénotypique entre les souches par taxonomie numérique.

Tous les tests réalisés sont étudiés sur milieux solides additionnés aux substrats d'intérêt. Pour quelques souches une galerie Api20NE est utilisée afin de se rapprocher phénotypiquement du genre ou de l'espèce bactérienne. La taxonomie numérique est établie par le logiciel Past 3, dont la matrice de similarité est établie par le coefficient de Jaccard et les dendrogrammes sont obtenus par deux algorithmes (UPGMA et NJ).

L'ensemble des tests morphologiques, physiologiques et biochimiques effectués, montrent que nos souches appartiennent aux plusieurs genres différents ainsi qu'ils peuvent utiliser diverses sources de carbone, d'azote et présentent une capacité à dégrader des composés complexes comme la cellulose et l'adénine et la gélatine. Certaines souches PGPR peuvent croître en présence d'inhibiteurs chimiques tels que le phénol et le crystal violet, et aussi en présence de différentes concentrations en pesticides (tilt et topic). Les souches étudiées ne tolèrent pas des concentrations élevées du NaCl mais elles ont une bonne croissance sur des milieux basique. L'utilisation de la galerie Api20NE pour quelques souches à permet d'attribuer phénotypiquement les souches aux genres *Pseudomonas sp*, *Aeromonas sp*, *Agrobacterium sp* et *Chryseobacterium sp*. L'établissement d'une taxonomie numérique sur l'ensemble des souches étudiées à permet les classés en groupes distincts. Dans ces groupes aucune similitude à 100% n'était observée. Selon le degré de similitude choisi, les bactéries à Gram négatif et à Gram positif sont regroupées en trois groupes différents. Les souches étudiées montrent des caractéristiques très importantes et qui encourage à leur application *in vivo* et qui ouvrent plusieurs perspectives telle que, l'étude de la capacité des souches à dégrader les pesticides et à développer la croissance des plantes dans des régions contaminées.

Mots clés : bactéries promotrices de croissance des plantes (PGPR), rhizosphère, bactérie, taxonomie numérique.

Abstract

The present work concerning the study of some bacterial strains isolated from the rhizosphere of « *Capsicum annuum* » in the region of Guelma. The objective of this work was the morphological study, determination of metabolic characteristics of strains and assessment of the phenotypic similarity between strains by numerical taxonomy. All tests performed are studied on solid media supplemented with the substrates of interest.

For some strains a gallery Api20NE is used to get closer phenotypic of type or of bacterial species. The numerical taxonomy is determined by the software Past 3, the matrix of similarity of which is established by the coefficient of Jaccard and dendrogramme is got by two algorithms (UPGMA and NJ).

All tests morphological, physiological and biochemical performed show that our strains belong to several different types, as well as they can use various sources of carbon, nitrogen and introduce a capacity to degrade complex compounds such as cellulose and the adenine and gelatin. Some PGPR strains can grow in the presence of chemical inhibitors such as phenol and crystal violet, and also in the presence of different concentrations of pesticide (tilt and topic). The strains studied cannot tolerate a high concentration of NaCl but they have good growth on basic media. The use of gallery Api20NE for some strains has allowed to allocate the strains phenotypically in types : *Pseudomonas sp*, *Aeromonas sp*, *Agrobacterium sp* et *Chryseobacterium sp*. The establishment of a numerical taxonomy on all studied strains classified the later into distinct groups. In these groups no similarity to 100% was noticed. According to the chosen degree of similarity, Gram positive and negative bacteria are regrouped in three different groups.

The strains studied showed very important characteristics and encouraging their application *in vivo* and open several perspectives such as the study of the ability of strains to degrade pesticides and develop plant growth in contaminated areas.

Keywords : plant growth-promoting bacteria (PGPR), rhizosphere, bacterium, numerical taxonomy.

الملخص

هذا العمل إرتكز على دراسة بعض السلالات البكتيرية التي تم عزلها من المنطقة الجذرية لنبتة الفلفل الحولية *Capsicum annuum* في منطقة قالمة. الهدف من هذه الدراسة هو تحقيق دراسة مورفولوجية و تحديد الخصائص الأيضية للسلالات المراد دراستها و تقدير نسبة التشابه الظاهري بين السلالات عن طريق التصنيف العددي.

جميع الاختبارات المحققة درست على أوساط صلبة أضيفت لتركيبها الأساسية مواد معينة ذات أهمية ، كما تم استعمال نظام Api20NE بهدف دراسة التقارب المظهري لبعض السلالات المدروسة. تم تأسيس التصنيف العددي بواسطة برنامج Past 3 و مصفوفة التشابه بين السلالات انشأت بالإعتماد على المعامل Jaccard , أما شجرة التطور الوراثي تم الحصول عليها بطريقة حساب الاختلافات و ذلك باستخدام الخوارزميتين NJ و UPGMA.

جميع الاختبارات المرفولوجية و الفيزيولوجية والبيوكيميائية التي اجريت تبين ان هذه السلالات تنتمي الى عدة أنواع مختلفة و يمكنها استخدام مصادر مختلفة من الكربون و النتروجين، كما لها القدرة على تحليل المركبات المعقدة مثل السيليلوز و الادنين و الجيلاتين. كما يمكن لبعض سلالات البكتيريا المساعدة على نمو النبتة ان تنمو في وجود مثبطات كيميائية مثل الفينول و الكريستال البنفسجي و ايضا في وجود تركيزات مختلفة من المبيدات. كما أن هذه السلالات لا يمكنها العيش في أوساط ذات تركيزات عالية من كلوريد الصوديوم و لكن لديها نمو جيد في الأوساط القاعدية.

تطبيق التصنيف العددي على مجموع السلالات المدروسة سمح بتقسيم هذه الأخيرة الى مجموعات متميزة. ضمن جميع هذه المجموعات لم يلاحظ نسبة تشابه قريبة من أو تساوي المئة, و تبعا لدرجة التشابه المحددة تم تصنيف السلالات الموجبة و السالبة الغرام الى ثلاثة مجموعات مختلفة.

استخدام نظام Api20NE على بعض السلالات سمح بالتحديد النمط الظاهري لأصناف : *Pseudomonas sp*

Aeromonas sp, Agrobacterium sp et Chryseobacterium sp

أظهرت هذه السلالات المدروسة خصائص و ميزات هامة محفزة ومشجعة على إستعمالها في الأوساط الحية، كما تسمح بطرح العديد من وجهات النظر في إستعمالها مثل : دراسة قدرة السلالات على تحليل و تفكيك المبيدات و تطوير نمو النبات في المناطق الملوثة.

الكلمات المفتاحية : البكتيريا المساعدة على نمو النبات PGPR ، منطقة الجذور ، البكتيريا، التصنيف العددي.