

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université de Ghardaia



Faculté des Sciences de la Nature et de Vie et Sciences de la Terre
Département de Biologie

Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de

MASTER

En : Science biologiques

Spécialité : Biochimie Appliquée

Par: Ouled Boulla Saida & Serhani Kenza

Thème

Les bactéries endosphériques à potentiel favorisant la croissance et /ou à effet antagoniste d'une plante spontanée saharienne

Soutenu publiquement, le 00/09/2020, devant le jury composé de :

M. DJELID Y.	Maitre Assistant A	Univ. Ghardaia	Président
M. BAKELLI A.	Maitre Assistant A	Univ. Ghardaia	Directeur de mémoire
Melle DJEMOUAI N.	Maitre Assistant A	Univ. Ghardaia	Examinatrice

Année universitaire : 2019 2020

Remerciements

Il est primordial de remercier "ALLAH" le tout puissant de tout ce qu'il nous apporte dans la vie et que nous avoir donné le privilège et la chance d'étudier et de suivre le chemin de la science et le courage pour réaliser ce travail.

Nombreuses sont les personnes que nous souhaite remercier pour nous avoir aidée et soutenue durant la réalisation de ce modeste mémoire.

En premier lieu, nous adressons l'expression de notre très vive et respectueuse gratitude à M. BAKELLI Aissa qui a accepté de diriger ce travail, avec beaucoup de rigueur et de patience, ses critiques et ses conseils nous ont été très bénéfiques.

Nos respects et notre reconnaissance vont au M. DJELLID Y.; C'est avec beaucoup de plaisir pour avoir accepté de présider ce jury ainsi que sa disponibilité, qu'il trouve ici le témoignage de notre profonde considération.

A Melle DJEMOUAI N. pour avoir acceptés d'examiner ce mémoire, mais également pour sa précieuse aide ainsi que sa disponibilité à notre égard.

Nous remercions également toute personne ayant contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

DÉDICACE

Je dédie ce travail

Avec un énorme plaisir, un cœur ouvert que je dédie mon travail à mes très chers et magnifiques parents qui m'ont soutenu tout au long de ma vie ;

et à notre collègue Serhani Kenza

À la mémoire de mon père ; je t'aime énormément

À ma mère ; Tu représentes pour moi la source de tendresse et l'exemple de dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager. Tu as fait plus qu'une mère puisse faire pour que ses enfants suivent le bon chemin dans leur vie et leurs études. J'espère qu'un jour, je pourrai leurs rendre un peu de ce qu'ils ont fait pour moi que Dieu leur prête bonheur et longue vie.

À mon frère Abdelkarime et À mon cher fiancé, que je remercie vous pour le soutien et le réconfort qu'ils m'ont apporté ; Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, le dévouement et le respect que j'ai toujours pour vous.

À mes frères Abdelkader et Mohammed, Lamia.

À mes très chères amis; Hadjira, Yamina, Sara, Khadidja, Fatima, Samira, Maria, Zaineb, Meriem, Fadila, Zahra et Ilhame

À tous ceux qui me sont chers

Que ce travail soit l'accomplissement de vos vœux tant allégués, et le fruit de votre soutien infaillible

SAIDA

Dédicace

À mes très chers parents aucune dédicace, aucun mot, ne saurait exprimer réellement mon profond amour, mon respect et ma vive gratitude.

À mon très cher Père l'homme de ma vie, mon exemple éternel, mon source de joie et de bonheur, qui m'a toujours soutenu, et a été toujours présent pour moi.

À la plus chère au monde, ma Mère la lumière de ma vie pour son amour, qui m'a toujours encouragé durant toutes mes années d'études.

À mon mari et sa famille

À mon binôme SANDA qui était une sœur plus qu'un binôme.

À mes frères et à toute la famille : oncles et tantes, cousins et cousine

À toutes mes amies surtout Hafsa.

À mes chers enseignants sans exception.

À mes collègues de promotion Biochimie Appliquée

À tous ceux que j'aime.

Kenza

RESUME

Les bactéries endosphériques englobe sous rhizobactéries qui jouent un rôle très important dans l'amélioration et promoteur de croissance de plants et parmi ces bactéries, Il y a ce que sont connues sous le terme de Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR).

L'objectif de ce travail est l'isolement et l'identification des bacteries endophytes qui ont été colonisée des racines de phragmites communis. Ils ont subi une caractérisation morphologique, physiologique, biochimique et la propreté PGP impliquées dans les processeurs de biocontrol, biofertilisant et fitostimulation.

On montre que les 26 isolats a testé ont différentes activités d'intérêt agricole (AIA, solubilisation de phosphate tricalcique, fixations d'azote, Solubilisation du potassium, formation de biofilm, pectinase, cellulase, amylase, ACC désaminase, HCN, NH₃ et la dégradation d'aluminium).

Les mots clé : Endosphériques, PGPR, endophytes,

Abstract

Endospheric bacteria encompasses rhizobacteria which play a very important role in improving and promoting plant growth and among these bacteria, there is what are known as Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR).

The objective of this work is the isolation and identification of endophytic bacteria that have been colonized from the roots of *Phragmites communis*. They underwent morphological, physiological, biochemical and PGP cleanliness characterization involved in biofertilizer, biocontrol and phytostimulation processors.

It is shown that the 26 isolates tested have different activities of agricultural interest (AIA,

solubilization of tricalcium phosphate, nitrogen fixation, Solubilization of potassium, formation of biofilm, pectinase, cellulase, amylase, ACC deaminase, HCN, NH₃ and degradation

aluminum).

The key words: Endospheric, PGPR, endophytes,

ملخص

تشمل بكتيريا endosphériques البكتيريا الجذرية التي تلعب دورا مهما للغاية في تحسين نمو النبات وتعزيزه و من بين هذه البكتيريا، هناك ما يعرف باسم البكتيريا الجذرية المعززة لنمو النبات (PGPR).

الهدف من هذا العمل هو عزل والتعرف على البكتيريا الداخلية التي تم استعمارها من جذور *Phragmites communis*. لقد خضعوا للتوصيف المورفولوجي والفسولوجي والكميائي الحيوي وخصائص النظافة PGP المشاركة في معالجات المكافحة الحيوية، الأسمدة الحيوية وتنشيط الجسم.

يتضح أن 26 عزلة تم اختبارها لها أنشطة مختلفة ذات أهمية زراعية (AIA)، إذابة فوسفات ثلاثي الكالسيوم، تثبيت النيتروجين، إذابة البوتاسيوم، التكوين من البيوفيلم، البكتيناز، السليلاز، الأميلاز، ACC deaminase، HCN، NH₃، والألمنيوم).

الكلمات الأساسية: endophytes، PGPR، Endospheric

Liste des abréviations:

ACC: 1-AminoCyclopropane-1-Carboxylate
AIA: Acide Indole Acétique
ALK: Alexandrov
BLAST: Basic Local Alignment Search Tool
BYDV: Barley Yellow Dwarf Virus
CMC: 1-carboxyméthylcellulose
CAS: Chrome Azurol Sulfate
DF: Dworkin et Foster
DAPG: 2,4-diacetylphoroglucinol
FAME: Fatty acid methyl esters
g: DTMA HexaDecylTriMethylAmmonium
h: Heure
H₂S: Sulfure d'hydrogène
ha: Hectares
HCN: Cyanure d'hydrogène
Ind: Indole
K: Potassium
kDa: Kilo dalton
l: Litre
LDC: Lysine décarboxylase
M: Molaire
Mm: Millimètre
Min: Minute
MO: Matière Organique
N: Azote
N₂: Nitrogène
Na: Sodium
NaCl: Chlorure de Sodium
NH₄⁺: Ion d'ammonium
NH₃: Ammoniaque
NO₃⁻: Nitrates
NO₂: Nitrite
P: Phosphore
PGP: Plant Growth Promoting
PGPB: Plant Growth Promoting Bacteria
PGPR: Plant Growth Promoting Rizobacteria
pH: Potentiel d'Hydrogene
PVK: Pikovskaya
RFCP: Rhizobactéries qui Favorisent la Croissance des Plantes
T: Température
UFC : Unité Formant Colonie

Liste des tableaux

Tableau 1: Dénombrement des bactéries rhizosphériques isolées	30	29
Tableau 2: Résultats de l'aspect macroscopique des bactéries rhizosphériques isolées		30
Tableau 3: Aspect microscopique des représentants des bactéries obtenues		32
Tableau 4: Tableau présentant le résultat globale d'analyse des activités PGP		24

Liste des figures

Figure 1: Schéma de la rhizosphère	4
Figure 2: Colonisation des racines par les bactéries rhizosphériques, les bactéries associatives et les bactéries endophyte	6
Figure 3: PGPR most frequently studied, grouping according their phylogenetic classification	9
Figure 4: Promotion de la croissance des plantes par les PGPR	12
Figure 5: Schéma général des voies de mobilisation et immobilisation du phosphore	13
Figure 6: Une carte montrant la wilaya de Ghardaïa au niveau de l'Algérie et le site d'échantillonnage au niveau de la vallée du M'Zab	20
Figure 7: Photo de <i>Phragmites communis</i> dans son aire d'origine	21
Figure 8: Etapes suivies pour l'isolement des souches à partir d'échantillons de sol	24
Figure 9: Deux photos montrant les bactéries rhizosphériques regroupées dans des groupes morphologiques	31
Figure 10: Quelques photos montrant l'aspect microscopique des représentants des bactéries obtenus	32

Table des matières

Remerciements	i
Dédicace	iii
Liste des abréviations	viii
Liste des tableaux	ix
Liste des figures	x
Sommaire	
Erreur ! Signet non défini.	
Introduction général	13
Chapitre I: Synthèse bibliographique	3
1. Rhizosphère	3
1.1. Généralités	3
1.2. Rhizobactéries	4
1.2.1. Bactéries endosphériques	5
1.2.2. Rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes (PGPR)	6
2. Ecologie microbienne de la rhizosphère	8
2.1. Définition	8
2.2. Diversité taxonomique des PGPR	8
2.2.1. Proteobactéries	10
2.2.2. Actinobactéries	11
2.2.3. Firmicutes	11
3. Mécanismes d'action des PGPR	11
3.1.1. Mécanismes directs	12
3.1.2. Mécanismes indirects	15
Chapitre II: Matériel et Méthodes	19
1. Description du site de prélèvement	19
1.1. Matériel biologique	21
1.1.1. Présentation de la plante étudiée	21

1.1.2. Généralités	21
1.1.3. Classification de <i>Phragmites communis</i>	22
1.2. Matériel non biologique	23
1.3. Echantillonnage	23
1.4. Isolement des bactéries endophytes	23
1.5. Identification des isolats bactériens	25
1.5.1. Examen macro-morphologique	25
1.5.2. Examen micro-morphologique	25
1.6. Screening de l'activité favorisant la croissance des plantes (PGPB)	26
1.6.1. Fixation d'azote	26
1.6.2. Solubilisation du phosphate inorganique	26
1.6.3. Solubilisation du potassium	26
1.6.4. Production de l'acide indole acétique (AIA)	26
1.6.5. Production d'auxine	27
1.6.6. Activité de la phytase (minéralisation du phosphate organique)	27
1.6.7. Production d'ammoniac	27
1.6.8. Production de sidérophores	27
1.6.9. Production d'HCN	27
1.6.10. Production d'enzymes	28
Chapitre III: Résultat et Discussions	29
1. Isolement et caractérisation des souches isolées	30
1.1. Etude microbiologique des bactéries rhizosphériques isolées	29
1.1.1. Caractérisation morphologique	29
1.2. Etude micro-morphologique	29
2. Evaluation du pouvoir PGPB des bactéries rhizosphériques isolées	343
3. Discussions générale	25
Conclusion	28
Références bibliographiques	
Annexe	

Introduction général

La qualité et la quantité des denrées alimentaires vont constituer des défis importants dans les années à venir. La croissance démographique continue exige la production de plus de produits agricoles et d'évoluer inévitablement vers une production accrue par unité de surface. Cela ne peut être réalisé sans l'application d'engrais chimiques ou biologiques. La gestion des engrais étant considérée comme l'un des principaux facteurs de l'agriculture durable, le remplacement progressif des engrais chimiques par des engrais biologiques est tout à fait inévitable en raison de leurs avantages et de leur rentabilité.

L'histoire de l'inoculation des plantes avec des bactéries utiles remonte à plusieurs siècles. Par exemple, par expérience, les agriculteurs savaient que si le sol dans lequel les légumineuses étaient plantées était mélangé à celui des cultures autres que les légumineuses, cela permettait d'augmenter le rendement des cultures. À la fin du XIXe siècle, la première licence de production d'un engrais biologique connu sous le nom de Nitragin a été délivrée pour la production d'inoculant à base de rhizobium et, par la suite, l'inoculation de légumineuses a commencé à être pratiquée dans de nombreux pays en utilisant des engrais à base de rhizobium (Bagnasco et al., 1998).

La rhizosphère, la zone étroite de sol qui entoure et influence les racines des plantes, abrite un grand nombre de micro-organismes et est considérée comme pouvant avoir des effets profonds sur la croissance, la nutrition et la santé des plantes dans les agro-écosystèmes (Berendsen et al., 2012 ; Mendes et al., 2011 ; Bonfante et al., 2009). Dans la rhizosphère, le microbiote peut contenir jusqu'à 10^{11} cellules microbiennes par gramme de racine (Egamberdieva, et al., 2008) et plus de 30 000 espèces procaryotes (Mendes et al., 2011). Les bactéries capables de coloniser les systèmes racinaires des plantes et de favoriser la croissance des plantes sont appelées rhizobactéries favorisant la croissance des plantes (PGPR) (Kloepper et Schroth, 1978).

Les PGPR peuvent affecter la croissance directement ou indirectement. La promotion directe de la croissance des plantes par les PGPR consiste soit à fournir aux plantes un composé synthétisé par la bactérie, soit à faciliter l'absorption de certains nutriments de l'environnement. Les mécanismes de contrôle biologique par lesquels les rhizobactéries peuvent promouvoir indirectement la croissance des plantes, c'est-à-dire en réduisant le niveau de maladie, comprennent l'antibiose, l'induction d'une résistance systémique et la compétition pour les nutriments et les niches. (Glick, 1995 ; Lugtenberg et Kamilova, 2009).

Les rhizobactéries fournissent des nutriments à la plante. Les bactéries fixatrices d'azote telles que *Rhizobium* et *Bradyrhizobium* peuvent former des nodules sur les racines de légumineuses telles que le soja, le pois, l'arachide et la luzerne, dans lesquels elles transforment l'azote en ammoniac, qui, contrairement à l'azote, peut être utilisé par la plante comme source d'azote (Spaink et al., 1998 ; van Rhijn et Vanderleyden, 1995). Également, certains PGPR solubilisent le phosphate à partir de phosphates liés organiques ou inorganiques, ce qui facilite la croissance des plantes (Lipton et al., 1987 ; Vassilev et al., 2006). Plusieurs bactéries ont la capacité de produire les auxines (les phytohormones) qui stimule la croissance des plantes. La production d'AIA par les isolats microbiens varie grandement selon les différentes espèces et souches et dépend de la disponibilité du ou des substrats

La promotion indirecte de la croissance des plantes se produit lorsque le PGPR atténue ou empêche les effets délétères d'un ou plusieurs organismes phytopathogènes. Cela peut se produire en produisant des substances antagonistes ou en induisant une résistance aux agents pathogènes (Glick, 1995). Le PGPR contribue également à la lutte contre les phytopathogènes, appelée biocontrôle. Les activités antagonistes suivantes de l'environnement rhizosphérique et des bactéries peuvent être mises en évidence : (1) synthèse d'enzymes hydrolytiques, telles que les chitinases, protéases et lipases, qui peuvent lyser les cellules fongiques pathogènes (Neeraja et al., 2010 ; Maksimov et al. 2011), (2) compétition pour les nutriments et colonisation appropriée des niches à la surface des racines (Stephens et al., 1993 ; Kamilova et al, 2005), (3) la régulation des niveaux d'éthylène des plantes par l'enzyme ACC-désaminase, qui peut agir pour moduler le niveau d'éthylène dans une plante en réponse au stress imposé par l'infection (Glick et Bashan, 1997 ; Van Loon, 2007), et (4) la production de sidérophores et d'antibiotiques.

Les sidérophores sont sécrétés par plusieurs PGPR pour solubiliser le fer de leur environnement (Andrews et al., 2003). Le sidérophore puissant, la pyoverdine, par exemple, peut inhiber la croissance de bactéries et de champignons qui présentent des sidérophores moins puissants dans des milieux appauvris en fer *in vitro* (Kloepper et al., 1980a).

Actuellement, il existe un intérêt croissant pour les tests de produits à base de PGPR dans les systèmes de production agricole. Ces produits sont principalement utilisés pour le traitement des semences, l'amendement du sol ou le trempage du sol au moment de l'ensemencement ou immédiatement après la transplantation, afin de favoriser la croissance des plantes et de supprimer efficacement plusieurs maladies dans un certain nombre de cultures (Kloepper et al., 2004).

Objectif de la présente étude :

L'objectif de la présente étude est d'isoler et caractériser le PGPR à partir des racines de *Phragmites communis* conférant des activités de biofertilisation. De telles souches de PGPR peuvent être utiles pour augmenter la production de différentes cultures de manière écologique.

Chapitre I: Synthèse bibliographique

I. Synthèse bibliographique

1. Rhizosphère

Le concept de rhizosphère a été développé par le microbiologiste visionnaire Hiltner qui perçut dès 1904 (Khakipour et al., 2008). « rhizo » vient du grec « rhiza » signifiant racine, « sphère » vient du latin « sfaire » signifiant balle, ballon ou globe. La sphère définit le champ d'influence du système racinaire (Hinsinger, 2010).

La rhizosphère est définie aujourd'hui comme étant le lieu d'interaction entre le sol ; la plante et les microorganismes. Ces interactions dépendent (Boullaras et Selmane, 2019) des conditions physiques du milieu et des organismes mis en jeu (Norini, 2007). C'est également un environnement caractérisé par un volume très élevé de substances racinaires favorisant une grande population microbienne (Miransari, 2011). Cette population originaire des grains et du sol environnant (Grayston et Campbell, 1996; Miethling et al., 2000; Marschner et al., 2001) est habituellement distribuée à une distance de 50 mm des racines de la plante, dont une concentration de plus de 10⁹ à 10¹² microorganismes par gramme de sol niche dans les 10 premiers mm (Miransari, 2011).

1.1. Généralités

Des pourcentages de 10% à 40% des composés photosynthétisés (à partir du CO₂ et de l'eau) par les plantes sont relargués dans la rhizosphère, soit sous forme de substances libérées directement par les racines (acides organiques, sucres) : c'est l'exsudation racinaire, soit sous forme de tissus végétaux détachés de la plante par frottements mécaniques. Cette « rhizo-déposition » est favorable à la multiplication des micro-organismes (bactéries et champignons microscopiques).

Dans le sol, les bactéries sont les organismes les plus variés et les plus nombreux, leur densité est de l'ordre de 10⁹ UFC par gramme du sol. Au niveau de la microflore se tient également une compétition sévère entre les bactéries. Bien qu'il y ait 100 à 1000 fois plus de bactéries dans la rhizosphère que dans le sol nu (Davet, 1996; Van Loon, 2007; Henao Valencia, 2008; Nabti et al., 2018), les espèces présentes sont 10 à 100 fois moins diversifiées. Seul un faible nombre de micro-organismes sont adaptés à ce milieu dans lequel ils prolifèrent de manière importante. Elle est, généralement, divisée en trois parties:

-endORIZOSPHÈRE (tissus racines) 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 (Dommergues et Mangenot, 1970).

-Le RHIZOPLAN : C'est la surface de la racine, où les particules du sol et les microbes adhèrent. Il est formé par l'épiderme, le cortex et la couche de polysaccharides mucilagineux.

-L'ECTORHIZOSPHÈRE ou EXORHIZOSPHÈRE au RHIZOSPHÈRE sol est la zone du sol influencée par les racines due à la libération de substrats qui influence l'activité microbiologique (Barea et al., 2005). Ou bien C'est la partie la plus externe; c'est-à-dire le sol qui est immédiatement adjacent à la racine (Figure 1).

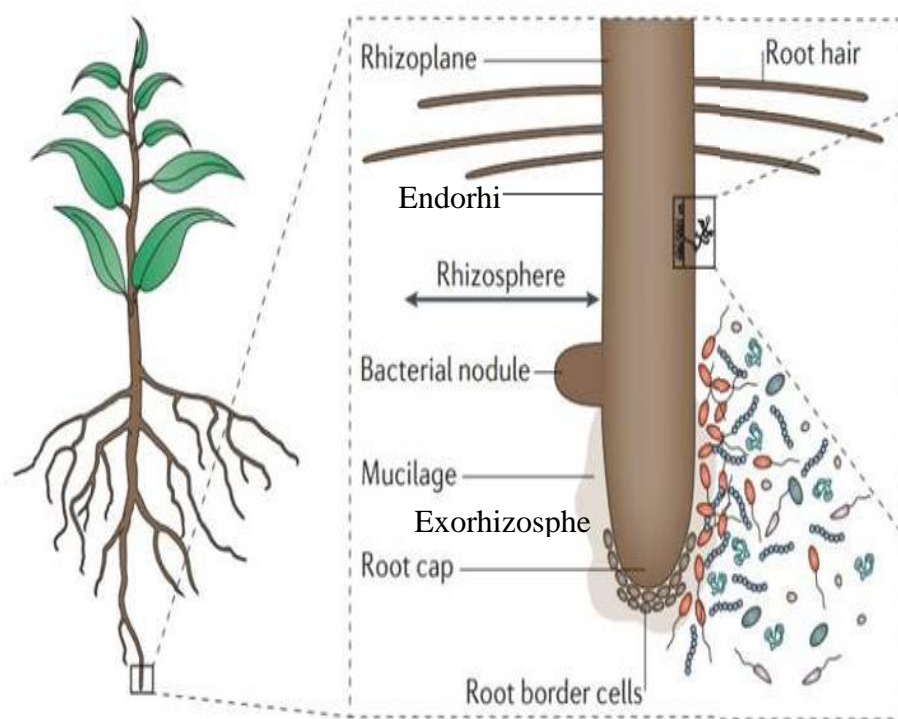


Figure 1: Schéma de la rhizosphère (Philippot et al., 2013)

1.2. Rhizobactéries

Les rhizobactéries sont des bactéries qui présentent l'aptitude à coloniser les racines de façon intense (Nemouchi et al., 2017). se présente dans le sol à des concentration allant de 10^6 à 10^9 Cfu.g⁻¹ de sol (Molop et al., 1987) celles-ci sont généralement des souches très compétitives capables de coloniser le système racinaire riche en éléments nutritifs, tout au long du cycle de développement de la plante (Kloepper, 1992; Nemouchi et al., 2017). Cette bactérie capable de se multiplier et de rivaliser avec les autres microorganismes pour occuper cette zone riche en éléments nutritifs.

L'association, le rôle et les effets que les rhizobactéries exercent sur la plante sont en fonction du succès de leur établissement dans la rhizosphère; elles peuvent avoir un effet positif, négatif ou neutre sur la croissance des plantes. Les effets bénéfiques des rhizobactéries sont liés à leur position stratégique à l'interface sol racine. En effet, le rhizo plan et la rhizosphère sont le siège d'échanges intenses entre la plante et le milieu environnant (Curl, 1968). Ces échanges sont réciproques (Abdesselam, 2017).

Elles présentent une variabilité quant a leur pouvoir de composer une large gamme de matériaux dans le sol sous des conditions diverses (Wood et Newonb, 1989 ; Kirdi, 2011). Près de 5% des rhizobactéries favorisent la croissance des plantes et les protègent contre les agents pathogènes tels les bactéries, les moisissures (Suslow, 1982; Weller, 1988) et les nématodes (Kloepper, 1992). L'inoculation des semences avec des rhizobactéries bénéfiques se traduit généralement par des accroissements de rendement d'environ 10 à 30% (Suslow, 1982).

Ces rhizobactéries appartiennent à différents groupes taxonomiques de bactéries. Elles ont été regroupées sous le nom de Rhizobactéries qui Favorisent la Croissance des Plantes (RFCP) ou Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) (Karima, 2018).

Les tissus de la racine peuvent même leurs servir d'habitat. Hors du cas bien connu des mycorhizes et des nodosités fixatrices d'azote, on constate que certaines bactéries vivent au contact direct de la racine et pénètrent dans les tissus rhizodermiques et corticaux, sans pour autant être parasites ou prédatrices. On appelle « histosphère », la région où les microorganismes habitent l'intérieur des tissus mais restent localisés à l'extérieur des cellules, et la « cytosphère », où les microorganismes habitent l'intérieur même des cellules (Gobat et al., 2003).

La rhizosphère est un site micro active plus important sur le plan chimique, biologique et écologique dans le sol (Toal et al., 2000). C'est la voie obligatoire de tous les minéraux de sol aux plantes, et un lieu d'interaction fortes entre les plantes et les microorganismes du sol (Walters et al., 2005).

Les interactions bénéfiques entre les plantes et les microorganismes dans la rhizosphère sont déterminantes pour la santé des plantes et la fertilité des sols (Gholami et al., 2012). Il est reconnu que ces interactions sont dépendantes des racines vivantes ou du matériel végétal mort disponible, mais également de l'agronomie et de l'écologie (Barea et al., 2005). Les microorganismes du sol sont d'une grande importance dans le cycle des nutriments et dans l'entretien de la santé et de la qualité du sol (Jeffries et al., 2003). Ils sont impliqués dans les activités fondamentales qui assurent la stabilité et la productivité du système agricole et de l'écosystème naturel (Barea et al., 2005).

1.2.1. Bactéries endosphériques

Les bactéries associées aux plantes et isolées du rhizoplan et du phylloplan sont connues sous le terme épiphytes de l'intérieur des tissus, qui y habitent sans nuire à leur hôte sont appelées endophytes (Andrews et Harris, 2000 ; Azevedo et al., 2000) (Figure 2).

Le terme : « endophyte » a été introduit par « Bary » en 1866. Selon sa définition, « les endophytes sont les micro-organismes qui résident dans les tissus de la plante et sont très différents de ceux trouvés à la surface de la plante » (Praptiwi et al., 2018)

Les bactéries endophytes peuvent être classées comme «obligatoire» ou «facultatif». Les bactéries endophytes obligatoires ou strictes sont strictement dépendantes de la plante hôte pour leur croissance et leur survie et la transmission à d'autres plantes se produit à la verticale ou par des vecteurs. Les bactéries endophytes facultatives ont au moins un stade de leur cycle de vie dans lequel ils existent en dehors des plantes hôtes (Baldani et al., 1997).

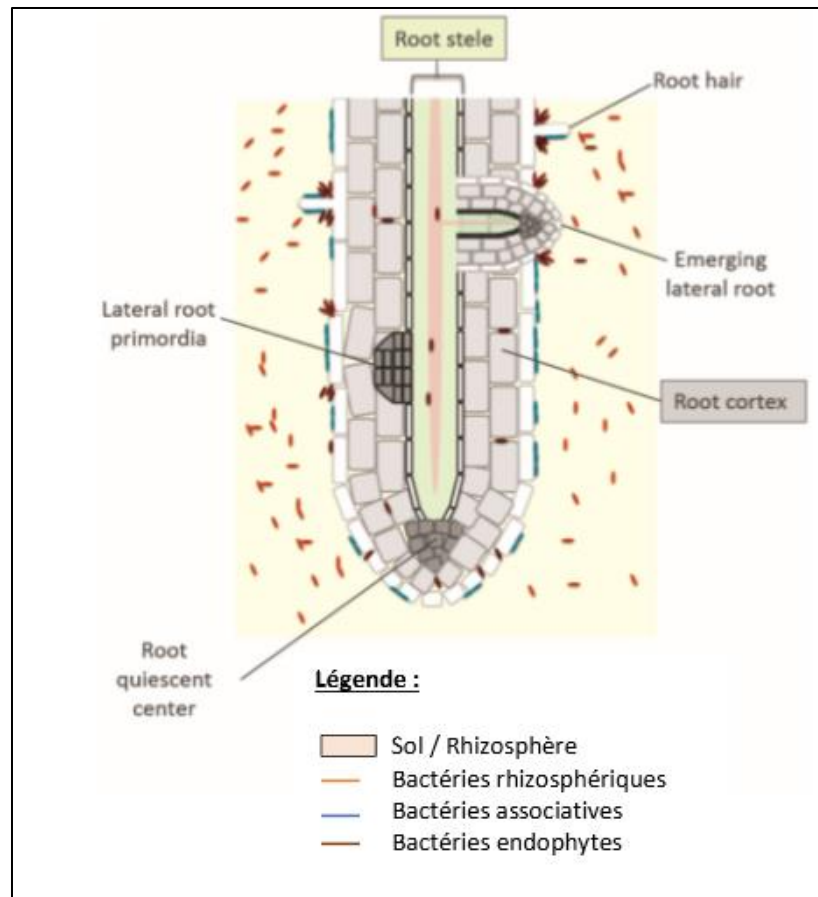


Figure 2: Colonisation des racines par les bactéries rhizosphériques, les bactéries associatives et les bactéries endophyte

1.2.2. Rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes (PGPR)

Dans le sol, l'activité microbienne est intense en particulier dans la zone sous l'influence des racines, la rhizosphère, qui contient plus d'un million de microorganismes par gramme de sol. Les micro-organismes trouvent en effet dans ce milieu des substrats énergétiques libérés par les racines et nécessaires à leur métabolisme : sucres, acides aminés, acides organiques, hormones... Certains de ces micro-organismes, principalement des bactéries, sont capables de coloniser efficacement les systèmes racinaires et influencent de manière bénéfique la plante en stimulant sa croissance et/ou en la protégeant contre des infections par des agents phytopathogènes. Ces bactéries de la rhizosphère sont alors reprises sous le terme Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR).

Les PGPR sont des bactéries qui interagissent avec les plantes à travers une étroite collaboration. Ces associations plante rhizobactéries ont été observées dès 1904 par Lorenz Hiltner (Hartmann et al., 2008). Les racines végétales sécrètent environ 30% des photosynthétats sous forme d'exsudats racinaires qui attirent, sélectionnent et maintiennent la microflore symbiotique au niveau des racines (Jones, 2003; Shi et al., 2011).

Ces rhizobactéries utilisant ces exsudats racinaires comme substrats nutritifs. A la différence des autres bactéries rhizosphériques, elles ont, en retour, un effet bénéfique sur la plante *via* une multitude de mécanismes (Vacheron et al., 2013). Par leur action enzymatique, elles solubilisent les éléments nutritifs présents dans les réserves organiques et minérales du sol tels que : le phosphate, l'azote et le fer, et les mettent à la disposition de la plante sous forme d'ions minéraux assimilables. Ces bactéries bénéfiques peuvent donc influencer l'acquisition des nutriments et aussi moduler les taux d'hormones et atténuer les impacts négatifs des facteurs biotiques et abiotiques (Maroua et Hanen, 2017). Ces bactéries sont capables d'interférer dans les réponses des plantes aux contraintes environnementales de façon direct ou indirectement (Bresson, 2013).

Le premier groupe influence directement le métabolisme de la plante en fournissant les substances qui sont habituellement en quantité limitée dans le sol. On y regroupe les bactéries capables de solubiliser les phosphates insolubles, d'augmenter la production des phytohormones et de fixer l'azote atmosphérique (Amarger, 2002). Elles peuvent aussi augmenter la tolérance des plantes à divers stress tels les pesticides et le stress hydrique y compris la sécheresse (Cohen et al., 2009).

Le deuxième groupe bactérien, nommé biocontrôle-PGPB, ne stimule pas directement le métabolisme de la plante. Par contre, il influence indirectement la croissance de celle-ci par la prévention des effets causés par des phytopathogènes tels des bactéries, des mycètes, des nématodes et des virus (Bashan et al., 1995)

Parmi les groupes microbiens du sol qui s'influent sur la croissance des plantes, on peut citer : *Rhizobium*, *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Azospirillum*, *Klebsiella*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Azotobacter* sp, *Serratia*, et en particulier le genre *Bacillus* qui forme des spores qui lui donne une certaine résistance à la température, et à la concentrations élevées des produits chimiques, impliquant un potentiel PGPR particulier (Kumar et al., 2012; Osman et al., 2017). En effet, la présence des PGPR dans la rhizosphère constitue un intérêt incontestable dans la croissance et le développement des plantes, leurs mécanismes stimulateurs de la croissance des plantes sont multiples (Nabti, 2007).

La densité de population des endophytes est très variable et dépend de l'espèce bactérienne, du génotype de l'hôte, de son stade de développement et des conditions environnementales (Dudeja et al., 2012)

Les PGPB endophytes stimulent la croissance des plantes en les aidant à acquérir des nutriments par, entre autres, la fixation d'azote, la solubilisation des phosphates, la chélation du fer et par la production de régulateurs de croissance ou phytohormones, comme les auxines, les cytokines et les gibbérellines. Plusieurs de ces endophytes ont un effet indirect sur la croissance de la plante. On leur a attribué un rôle dans l'induction des mécanismes de défense de l'hôte ainsi qu'un rôle de protection contre les pathogènes. C'est par la sécrétion de substances antifongiques et antibactériennes ou par la compétition pour la colonisation des sites et l'utilisation des nutriments que les endophytes protègent l'hôte (Compant et al., 2005).

2. Ecologie microbienne de la rhizosphère

2.1. Définition

Ecologie microbienne Brock a défini l'écologie microbienne comme étant « l'étude du comportement et des activités des micro-organismes dans leurs environnements naturels.

L'activité microbienne est plus grande dans la rhizosphère riches en matières organiques. Les rhizodépôts libérés qui diffère selon les génotypes végétaux par les plantes stimulent une microflore microbienne, abondante et active dans la rhizosphère. Le nombre et l'activité des micro-organismes du sol dépendent dans une large mesure des quantités de nutriments présents. Le coût pour la plante correspondant à la libération de ces rhizodépôts est contrebalancé par le bénéfice issu des effets positifs de certaines populations microbiennes rhizosphériques sur la croissance et la santé de la plante-hôte (Garcia et al., 1974). Les nutriments limitant dans les sols sont souvent les nutriments minéraux tels que le phosphore et l'azote (Madigan et al., 1997).

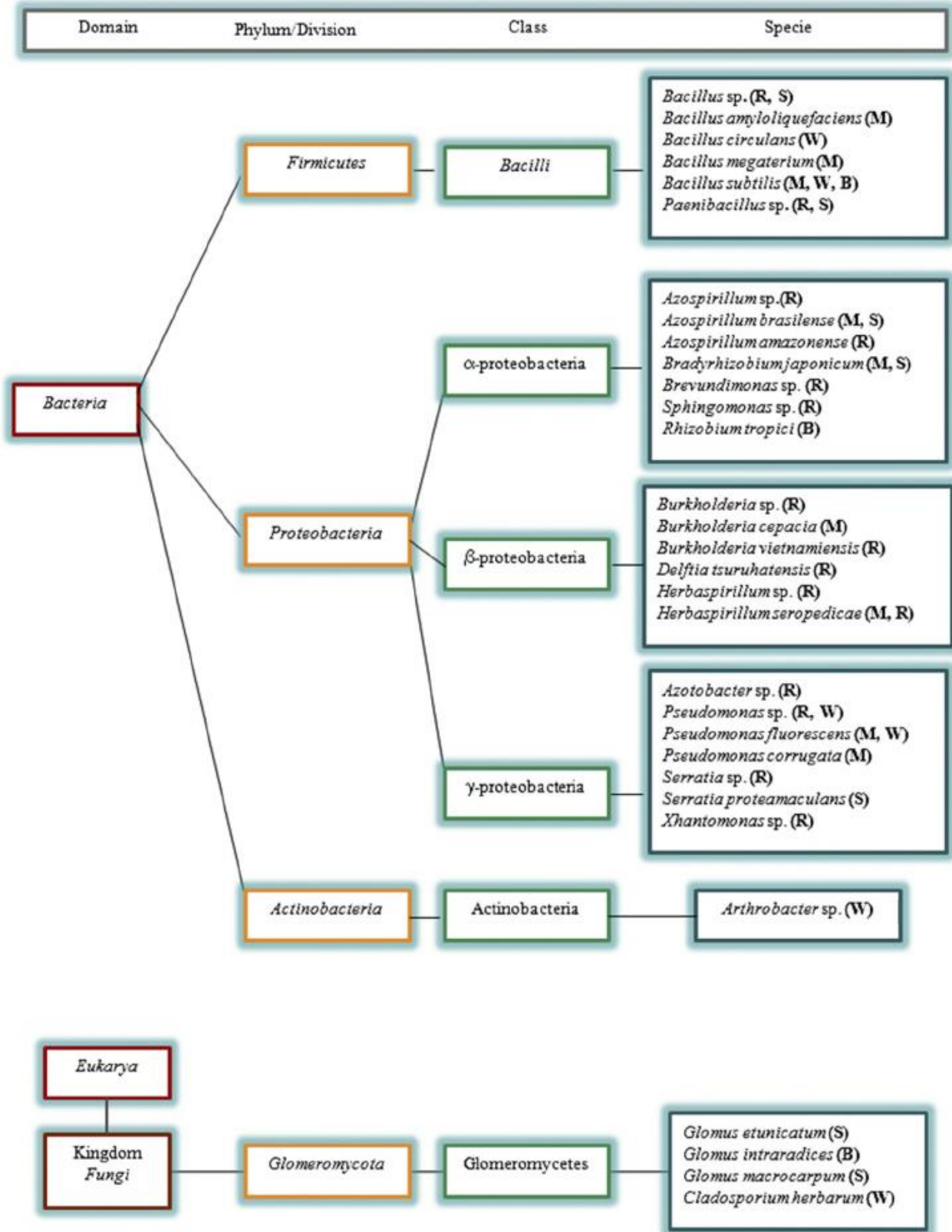
Outre l'action des plantes sur la diversité des communautés bactériennes rhizosphériques, les conditions environnementales jouent un rôle important dans le déterminisme de cette diversité, comme cela a été montré pour le type de sol et de ses paramètres physico-chimiques sur la structure, les fonctions et la diversité des communautés rhizosphériques (Lopez, 2018).

2.2. Diversité taxonomique des PGPR

La taxonomie est définie comme la science consacrée à l'étude des relations entre les organismes et concerne leur classification, nomenclature et identification (Mayr 1969; Coenye, Gevers et al., 2005). Une comparaison précise des organismes dépend d'un système taxonomique fiable donc PGPR ont été suffisamment étudiés, les découvertes de nouvelles souches il est augmenté les dernières années, révélant des taxons très divers

Les PGPR présentant une diversité de genres et d'espèces, appartiennent majoritairement aux quatre phyla suivants:

Proteobactéries, Firmicutes, Actinobactéries et Bactéroidetes (Figure 3) (Hugenholtz, 2002).



Plants where these microorganisms have been studied: M: maize, R: rice, W: wheat, S: soybean, B: bean

Figure 3: PGPR most frequently studied, grouping according their phylogenetic classification (Pérez-Montaño et al., 2014)

2.2.1. Proteobactéries

(a) Alphaproteobacteria

Les rhizobiums, ou rhizobia, sont des bactéries amélioré la croissance de pant par la capacité de fixation d'azote atmosphérique appartenant à la classe d'alphaproteobacteria. Les PGPR sont des bactéries capables d'établir une symbiose fixatrice d'azote avec des plantes de la famille des légumineuses. Ces bactéries peuvent se comporter comme PGPR quand elles colonisent les racines des plantes non légumineuses dans une relation non spécifique (Cherif, 2018).

En effet, le genre *Rhizobium* contient également des souches PGPR. Elle comprend de nombreux genres de bactéries phototrophes pourpres non sulfureuses tels que *Rhodovulum*, *Rhodobium* et *Rhodopseudomonas*. Ces genres sont regroupés dans trois ordres (*Rhodospirillales*, *Rhodobacterales* et *Rhizobiales*) (Bertrand et al., 2000). Le genre *Gluconacetobacter* de la famille des *Acetobacteraceae* composé de bactéries endophytes obligatoires colonise les racines, la tige et les feuilles de la canne à sucre (Tejera et al., 2003).

(b) Betaproteobacteria

Elle comprend quelques bactéries phototrophes pourpres non sulfureuses. Elles constituée de 6 ordres.

L'ordre des Burkholderiales regroupe 5 familles de bactéries ; *Ralstoniaceae* avec *Ralstonia metallidurans*, *Burkholderiaceae* avec *Burkholderia*, *Alcaligenaceae* avec *Alcaligenes*, la famille *Comamonadaceae* comprend de nombreuses bactéries (*Comamonas*, *Aquabacterium*, *Sphaerotilus...etc.*), *Oxalobacteraceae* avec *Oxalobacter*.

L'ordre des Methylophilales concerne des bactéries méthylotrophes regroupées dans une famille (*Methylophilaceae*) avec les genres *Methylophilus*, *Methylobacillus*, etc...

L'ordre des Neisseriales avec une famille (*Neisseriaceae*) contient des bactéries très pathogènes (*Neisseria gonorrhoeae* et *Neisseria pneumoniae*, etc.) et aussi des bactéries isolées du sol (*Aquaspirillum*). L'ordre de Nitrosomonadales avec la famille *Nitrosomonadaceae* oxydant l'ammonium (*Nitrospira* et *Nitrosomonas*), la famille *Gallionellaceae* ferro-oxydantes (*Gallionella*) et la famille *Spirillaceae* (*Spirillum*) (Daoud et Kreiri, 2016).

(c) Gamma-proteobacteria

Elle comprend le plus grand nombre de Proteobacteria regroupées dans 13 ordres, parmi ces ordres :

Les Pseudomonadales comprennent deux familles, les *Pseudomonadaceae*, le genre *Azotobacter* avec les genres *Pseudomonas*, bactéries communes des sols et des eaux, et les *Moraxellaceae* avec les genres *Moraxella*, *Acinetobacter*, rencontrés dans les sols (Daoud and Kreiri, 2016).

De plus, *Pseudomonas* est le genre le plus abondant dans la rhizosphère parmi les bactéries à Gram-négatif du sol, et l'activité PGPR de certaines de ces souches est connue depuis de nombreuses années, résultant d'une large connaissance des mécanismes impliqués. Par contre, les genres inclus dans la famille des Enterobacteriaceae assurant la fonction de PGPR sont *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Kluyvera*, *Pantoea* et *Serratia* (Garrity, 2005; Cherif, 2018).

2.2.2. Actinobacteria

La majorité des espèces dans le genre *Frankia* sont saprophytes ou commensales et principalement telluriques; quelques-unes (ex *Mycobacterium*) peuvent être pathogènes chez des individus à résistance affaiblie. Quelques-unes vivent en symbiose à l'intérieur de plantes pour lesquelles elles fixent l'azote de l'air (Bergey's 2010).

D'autres Actinobacteria sont également des promoteurs de croissance des plantes mais ne participent pas à la symbiose. Ils appartiennent aux genres 11 *Arthrobacter*, *Micrococcus*, *Curtobacterium* et *Streptomyces* (Cherif, 2018).

2.2.3. Firmicutes

Parmi les bactéries telluriques à Gram positif, les *Bacillus* sont les types les plus communs et les plus prédominants, ils représentent 95% de la flore isolée. Ce sont des bactéries aérobies ou aéro-anérobies facultatives formant des endospores. Depuis la découverte de la bactérie (1913) le genre *Bacillus* a subi des changements taxonomiques considérables la réorganisation de ce genre a été initiée en 1992 par la création des 37 nouveaux genres avec *Bacillus* sont inclus dans l'ordre des Bacillales et la famille des Bacillaceae (Bergey's 2010; Govindasamy et al., 2010; Daoud and Kreiri, 2016).

3. Mécanismes d'action des PGPR

Nombreux groupes de recherche travaillent sur les PGPR afin d'élucider leurs modes d'action (Vacheron et al., 2013). Les modes d'action des PGPR sont regroupés traditionnellement en directs et indirects (Figure 4). Bien que la différence entre les deux ne soit pas toujours évidente (Karima 2018). Ces qui participent par des modifications globales du fonctionnement des plantes à l'amélioration de la santé des plantes (Bresson, 2013).

Le premier groupe influence directement le métabolisme de la plante en fournissant les substances qui sont habituellement en quantité limitée dans le sol. qui regroupe les bactéries capables de solubiliser les phosphates insolubles, d'augmenter la production des phytohormones et de fixer l'azote atmosphérique (Bashan et al., 1995; Amarger, 2002). Tandis que les mécanismes indirects, en général, sont ceux qui se produisent en dehors des plantes et touchent surtout tout ce qui est en relation avec le bio contrôle. Sur la base de leur activités (Somers et al., 2004) sont classés les PGPR comme biofertilisants (augmentant la disponibilité des éléments nutritifs aux plantes), phytostimulateurs (améliorant la croissance des plantes, habituellement par la production de phytohormones) et biopesticides (lutte contre les maladies).

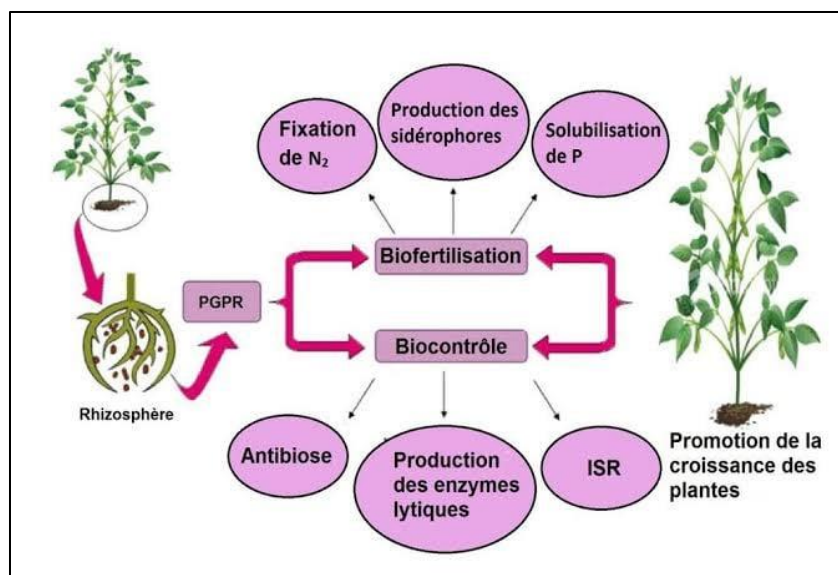


Figure 4: Promotion de la croissance des plantes par les PGPR (Cherif, 2018)

3.1.1. Mécanismes directs

La promotion directe de la croissance des plantes peut se produire par plusieurs processus :

(a) Biofertilisation

Certaines souches de PGPR des genres *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Azospirillum*, *Rhizobium* ont récemment été décrites pour leur effet indirect positif sur la croissance des plantes et l'augmentation du rendement de la culture (Vessey, 2003) Les PGPR peuvent favoriser la croissance des plantes hôtes par divers mécanismes.

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 biologique de l'azote par les bactéries du sol est considérée comme l'un des principaux mécanismes par lequel les plantes bénéficient de l'association microbienne (Karima, 2018).

Les microorganismes à associations symbiotiques produisent 80% de l'azote et le reste provient des systèmes libres ou associés (Cherif, 2018). Les bactéries fixatrices d'azote possèdent un complexe enzymatique, appelé nitrogénase (Glick 1995). La nitrogénase est une enzyme complexe formée de deux sous-unités : la dinitrogénase qui est une protéine à fer et à molybdène (NifHDK) et la dinitrogénase réductase qui est une protéine à fer (NifH) et qui transfère les électrons d'un donneur à la nitrogénase (Burris et Roberts, 1993). Cette dernière assure la réduction de l'azote moléculaire en ammoniacque (Chahrazed, 2017). L'utilisation de PGPR pour le développement durable de l'environnement et de l'agriculture a considérablement augmenté dans plusieurs régions du monde. Les microorganismes prennent de l'importance dans

l'agriculture en favorisant la circulation des éléments nutritifs (Şahin et al., 2004; Orhan et al., 2006).

Solubilisation de phosphate

Le phosphore et le deuxième nutriment important limitant la croissance des plantes après l'azote (Khan et al., 2009). Il existe dans le sol sous forme de sels minéraux ou incorporé dans des composés organiques. la majorité d'entre eux se présente sous une forme insoluble (Otieno et al., 2015; Alori et al., 2017).

La solubilisation des phosphates est la capacité des microorganismes de convertir le phosphate insoluble à une forme accessible (Chaiarn et Lumyong, 2009). Le principal mécanisme de solubilisation des phosphates est la production d'acides organiques: Les acides gluconiques et 2-cétogluconique sont les plus fréquemment rencontrés (Karima, 2018), et aussi par l'excrétion des enzymes extracellulaires telles les phosphatases, les phytases et C-P lyases (Kim et al., 1997; Weyens et al., 2010). Les microorganismes solubilisant les phosphates (MSP) pourraient aussi faciliter la croissance et le développement des plantes par la production de nutriments essentiels, modifier la concentration des substances telles que l'AIA ou stimuler la fixation de l'azote symbiotique et non symbiotique. Ils peuvent jouer aussi un rôle dans la production des sidérophores, des antibiotiques et d'acide cyanhydrique (HCN) (Figure 5) (Khan et al., 2009).

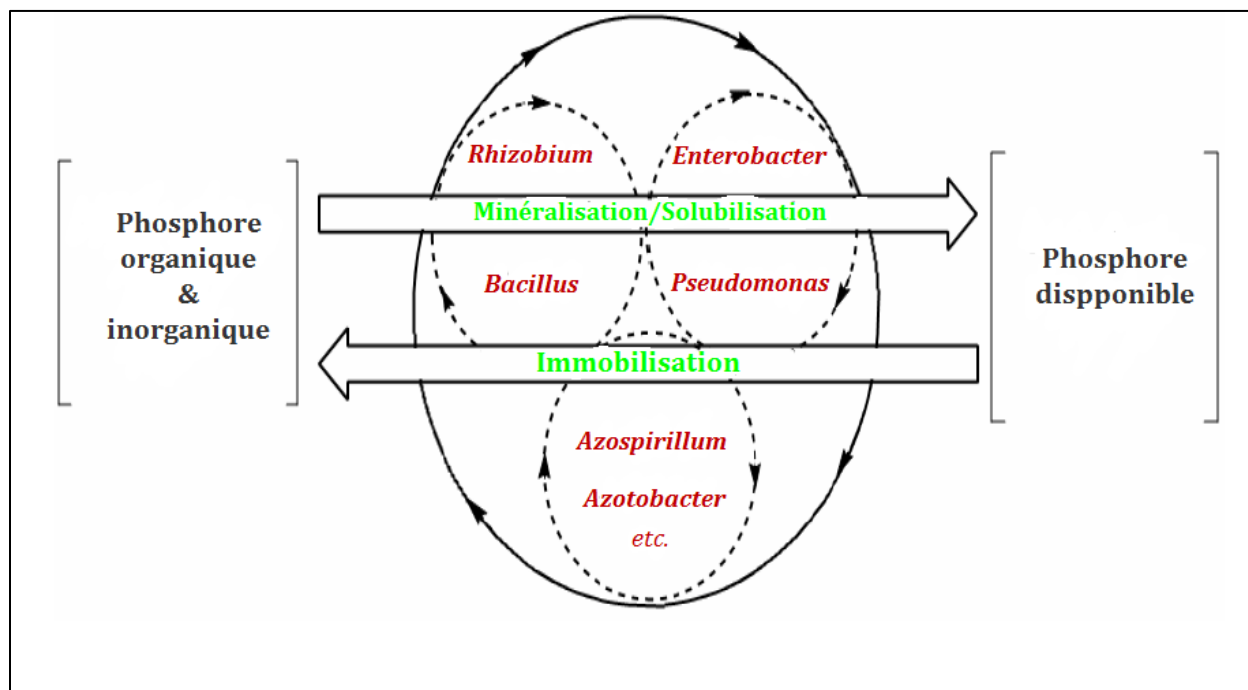


Figure 5: Schéma général des voies de mobilisation et immobilisation du phosphore dans le sol par les bactéries (Khan et al., 2009)

Solubilisation de potassium

Le potassium (K) est le troisième nutriment majeur essentiel pour la croissance des plantes. Il joue un rôle essentiel dans l'activation des enzymes, la synthèse des protéines et la photosynthèse. Le potassium dans le sol est présent soluble dans l'eau (solution K), échangeable, non-échangeable et sous formes structurales ou minérales même les PGPR peuvent induire la stimulation de la croissance par la mobilisation du potassium insoluble présent dans le sol (Djerdjouri, 2012).

Production de sidérophores

Les sidérophores sont des molécules capables de complexer le fer (littéralement : porte-fer). Bien que le fer soit l'un des minéraux les plus abondants sur terre. Dans le sol, il est indisponible pour l'assimilation directe par les microorganismes car l'ion ferrique (Fe_3^+),

forme prédominante dans la nature, est peu soluble (Boularas et Selmane, 2019). La plupart des microorganismes ont donc développé un mécanisme hautement spécifique afin de l'assimiler via la production de sidérophores (Han et al., 2005; Baca et Elmerich, 2007; Kloepper et al., 2007; Martínez-Viveros et al., 2010).

Les sidérophores sont sécrétés pour solubiliser le fer dans leurs environnements formant un sidérophore ferrique complexe qui peut se déplacer par diffusion et être renvoyé dans la surface de la cellule (Andrews, Robinson et al. 2003; Bouthaina and Ahlem 2017). Presque 500 structures de sidérophore sont connues jusqu'ici, qui sont produites par des bactéries, des mycètes et des plantes (Boukhalfa et Crumbliss, 2002).

(b) Phytostimulation

(i) Production des phytohormones

plusieurs PGPR ainsi que certaines espèces de rhizobactéries pathogènes, symbiotiques et libres ont été signalés comme pouvant moduler les niveaux d'hormones végétales par la production d'auxines (l'acide indole 3- acétique AIA, particulièrement), de gibbérellines et de cytokinines dans le sol rhizosphérique (Han et al., 2005). Peuvent ainsi affecter la prolifération cellulaire dans l'architecture racinaire par la surproduction de racines latérales et de racines avec un accroissement subséquent de l'apport d'éléments nutritifs et d'eau (Arora et al., 2013).

Les phytohormones, molécules organiques signales agissant comme des messagers chimiques et régulateurs de la croissance, se trouvent en très faibles concentrations, influencent des processus biochimiques, physiologiques morphologique et leur synthèse est finement régulée (Laradj Zazou, 2017).

Auxines

L'AIA est le plus important du groupe des auxines (Ashrafuzzaman et al., 2009) et quantitativement le plus produit par les PGPR (Cherif, 2018). Elle est impliquée dans plusieurs processus, y compris la division cellulaire, la différenciation et la formation de faisceaux vasculaires, et elle a un effet positif sur l'initiation de la croissance et l'élongation des racinaires. Elle augmente également la ramification des racines et améliore l'absorption de minéraux et d'eau (Patel et al., 2010; Ahemad et Kibret, 2014; Gupta et al., 2015).

Gibbérellines et cytokinines

Les cytokinines sont des phytohormones dérivées de l'adénine, elles jouent un rôle-clé dans un grand nombre de processus physiologiques tels que le contrôle de la division cellulaires, nécessaire à la formation et la croissance des bourgeons et la croissance des tissus en culture. Les cytokinines favorisent la croissance des racines et la différenciation, et elles peuvent également stimuler la germination et retarder le vieillissement des feuilles (Nabors, 2008).

Gibbérellines sont produites à la fois par les plantes supérieures et les champignons, le seul groupe d'hormone végétale qui peut être caractérisées par leur structure chimique plutôt que par leur activité biologique. Elles est impliqué dans la modification de la morphologie de la plante qui stimulent l'allongement des tiges, la croissance des feuilles et des fruits et lèvent la dormance des semences et des bourgeons (Holguin et Patten, 1999).

Ethylène

L'éthylène est un régulateur impliqué dans la stimulation de la croissance des plantes à des concentrations modérées. Dans les conditions du stress (salinité, pollution par les métaux lourds...etc.), la plante augmente la sécrétion de l'éthylène, ce qui induit l'inhibition de la croissance des racines (Saleem et al., 2007).

Aminocyclopropane-1-carboxylate Désaminase

L'ACC est le précurseur direct de l'éthylène. La biosynthèse de l'éthylène se fait par les plantes à partir de la méthionine. La première étape est la synthèse de la S-adenosylméthionine, suivie de sa conversion en 1 acide aminocyclopropane-1-carboxylique (Abdesselam, 2017).

L'éthylène est une phytohormone capable de lever la dormance des graines. Elle favorise également la maturation des fruits et déclenche l'abscission des feuilles (Bleeker et Kende, 2000).

Il a été rapporté que les PGPR qui produisent l'enzyme ACC (1-aminocyclopropane-1-carboxylate) désaminase qui est impliquée dans le catabolisme de la ACC (un précurseur de l'hormone végétale, l'éthylène), peut réduire la concentration de ce dernier dans une plante en développement ou stressée, ce qui les protègent contre les effets délétères du stress de l'éthylène et facilitent la formation de racines plus longues (Penrose et Glick, 2003).

3.1.2. Mécanismes indirects

Les PGPRs jouent un rôle majeur dans la lutte contre ces agents, où un large spectre des maladies bactériennes, fongiques et parasitaires est supprimé via la production d'antibiotiques, compétition (pour les éléments nutritifs, l'oxygène et l'espace), l'activation de la résistance systématique induite (ISR) et la production des enzymes (chitinase, protéase et lipase), cette protection est nommée biocontrôle.

De plus, les PGPRs peuvent être utilisées comme un biofertilisant efficace dans l'amélioration du rendement des cultures par la production d'enzymes telles que (cellulases, amylases, etc.) (Glick, 2012).

(a) Biocontrôle**(i) Compétition**

La compétition pour l'espace et les nutriments est un mécanisme biologique utilisé par les PGPRs pour éliminer les phytopathogènes. Cette compétition entre deux ou plusieurs microorganismes concerne soit les éléments nutritifs, l'espace ou les autres facteurs environnementaux qui deviennent limitatifs pour leur croissance (Dommergues et Mangenot, 1970; Shameer et Prasad, 2018).

En occupant la même niche écologique qu'un agent pathogène, un microorganisme peut entrer en compétition avec l'agent pathogène au niveau des nutriments, ce qui peut diminuer ou même empêcher la croissance de cet agent pathogène (Belkadi et Koliai, 2016).

Les PGPR doivent être présents en nombre suffisant sur les racines pour avoir un effet bénéfique sur les plantes et pour être capables d'instaurer une compétition pour les nutriments dans la rhizosphère (Podile et Kishore, 2007).

(ii) Antibiose

La sécrétion de substances antibiotiques par les microorganismes est un phénomène fréquent. Certains métabolites sont capables d'interférer avec la germination, la croissance mycélienne et/ou la sporulation des agents phytopathogènes. D'autres entraînent le relargage de composés cellulaires suite à la perturbation de la perméabilité cellulaire. L'antibiose est le mode d'action le plus étudié chez les agents de lutte biologique (Jijakli 2003). Il est synthétisé par les populations microbiennes antagonistes.

L'antagonisme microbien résulte à la fois de la compétition qui s'exerce en particulier pour les composés organiques du fait de la forte densité de microorganismes hétérotrophes dans l'environnement oligotrophe que constitue le sol. Elle s'exerce également pour le fer (Fe^{+++}) qui est essentiel pour le métabolisme des plantes et des microorganismes (surtout ceux qui sont aérobies) alors que sa biodisponibilité est faible dans les sols cultivés (Réale et al., 2007).

Bien que l'HCN soit un agent phytotoxique capable de perturber l'activité enzymatique impliquée dans les processus métaboliques majeurs, son rôle en tant que substance de biocontrôle est important. L'HCN est hautement toxique pour tous les microorganismes aérobies à des concentrations de picomolaires ; il peut bloquer la voie de la cytochrome oxydase (Voisard et al., 1989).

(iii) Parasitisme

Ce mécanisme de lutte consiste en une interaction directe entre deux microorganismes où les tissus vivants de l'un constituent une base nutritive pour l'autre (Helluy et Holmes, 2005). Il implique l'invasion des cellules de l'agent pathogène par le microorganisme antagoniste. L'agent antagoniste utilisera des enzymes lytiques telles que les glucanases, les chitinases et les lysozymes pour dégrader les parois de l'agent pathogène (Corbaz, 1990).

(iv) Résistance systémique induite « ISR »

Certaines souches de PGPR peuvent protéger les plantes d'une façon indirecte par stimulation de mécanismes de défense inductible dans la plante en rendant l'hôte beaucoup plus

résistante aux agents pathogènes. Ce phénomène a été nommé «résistance systémique induite» (Silia et Narimane, 2014).

L'induction de la résistance systémique (ISR) a été rapportée comme l'un des mécanismes par lesquels les PGPR réduisent les maladies des plantes, par la manipulation des propriétés physiques et biochimiques de la plante hôte (Pieterse et al., 2002).

(v) Production d'enzymes hydrolytiques

Les enzymes sont des catalyseurs essentiels dans le processus de la vie, même dans le sol, elles sont connues par leur importance dans le maintien de la santé du sol. L'activité enzymatique dans le sol est principalement d'origine microbienne (Das et Varma, 2010), telles que : l'amylase, protéase, phosphatase, lipase, cellulase, estérase et l'uréase (Carrim et al., 2006) ces enzymes à un rôle très importante dans le processus global de la décomposition de la matière organique dans l'environnement en protégeant ainsi les plantes des stresses biotiques et abiotiques (Hanane et Lamia, 2018).

Activité cellulasique

La cellulose est le composé organique le plus abondant dans la biosphère, comportant presque 50% de la biomasse synthétisée par la fixation photosynthétique du CO₂ (Amina, 2013) se réfèrent à une classe d'enzymes qui catalysent l'hydrolyse des liaisons 1, 4 β-D glycosidiques et sont principalement produites par les champignons, les bactéries et notamment les bactéries halophiles (Béguin et Aubert, 1994) et ont un large éventail d'applications dans les industries du textiles pour le bioblanchiment des tissus, aussi bien que dans les détergents de blanchisserie utilisés pour ramollir les tissus (Kaur et al., 2007).

Activité amylosique

L'α-amylase [α -(1,4)-D-glucane glucanohydrolase] comme toutes les enzymes est une macromolécule appartenant à la classe des protéines globulaires (Nouadri 2011). Les α – amylases sont des endo-enzymes dont la masse moléculaire est comprise entre 50 et 60 kDa (Feillet 2000), qui hydrolyse au hasard les liaisons osidiques (1,4), de l'amylose, de l'amylopectine, de l'amidon et du glycogène à l'exclusion des liaisons terminales de ces chaînes.

Les amylases sont produites par de nombreuses bactéries isolées du sol rhizosphérique, donnent de meilleurs résultats à la production d'amylase à une température de 37°C et un pH 7.5. Ces enzymes sont fortement stables a pH acide (pH 5.5), ce qu'ils les rendent en grand intérêt dans l'industrie (Céline et Nawel, 2017).

Activité chitinasique

Les chitinases ou enzymes chitinolytiques sont principalement responsables de la dégradation de la chitine (poly β-1-4- (2-n acétamide-2-désoxy) - D-glucoside). Elles sont également considérées comme éléments principaux dans l'élaboration des parois cellulaires des champignons (Chet et Chernin, 2003), inversement, les enzymes provenant des bactéries sont aussi impliquées dans la dégradation des parois cellulaires des mycètes pathogènes.

Activité phosphatasique

Les phosphatases sont un large groupe d'enzymes hydrolysant des esters et des anhydrides de l'acide phosphorique. jouent un rôle principal dans l'activité biologique du sol (Laradj Zazou, 2017).

La forme insoluble du phosphore est convertie en ions monobasiques; (H_2PO_4^-) et (HPO_4^{2-}). Ce processus est dit solubilisation minérale du phosphore. Ce qui induit une augmentation de la disponibilité du phosphore et sa prise par les plantes et cette activité serait dû à la synthèse des phytases (Alabouvette et al., 2006).

Activité protéasique

Les protéases jouent un rôle significatif dans la minéralisation de l'azote dans le sol. C'est un processus important dans la disponibilité de l'azote et donc dans la croissance des plantes (Petit et Jobin, 2005; Nannipieri et al., 2011). L'activité protéasique influence indirectement la synthèse des auxines en libérant les acides aminés comme le tryptophane qui est le précurseur de la synthèse de l'AIA et d'autres substances appariées (Mansour et al., 1994). Ils jouent également un rôle important dans la lyse de la paroi cellulaire des champignons phytopathogènes. Certaines des protéases sont impliquées dans l'inactivation des enzymes extracellulaires des champignons phytopathogènes (Elad et Kapat, 1999).

Activité lipasique

La production de lipases est influencée par la nature et la disponibilité de la source de carbone et d'azote. Les lipases peuvent agir en tant qu'hydrolases en milieu aqueux ou comme catalyseurs en synthèse organique. En tant qu'hydrolases, elles sont responsables du catabolisme des triglycérides et leurs substrats préférentiels qui sont les acides gras et le glycérol (Guzmán et al., 2008).

Chapitre II: Matériel et Méthodes

II. Matériel et méthodes

Notre travail qui porte sur l'isolement, sélection et l'identification des bactéries endophytes de PGPR performante et résistante aux stress biotique et abiotique a été réalisée au niveau de laboratoire de projet de fin d'étude (PFE) de département de Biologie de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie de l'Université de Ghardaïa sur une période de 4 mois allant de février jusqu'au mai 2020.

1. Description du site, prélèvement

Les prélèvements des échantillons de la plante sélectionnée dans le cadre de cette étude ; *Phragmites communis* pour l'isolement des bactéries associées à sa rhizosphère proviennent de la vallée du M'Zab dans la wilaya de Ghardaïa.

La Wilaya de Ghardaïa, l'une des plus importantes wilayas du sud de l'Algérie est assise sur une superficie de 86.560 km². Situé dans la partie septentrionale et centrale du Sahara (région programme Sud/Est) entre 4° et 7° de longitude Est et 35° et 36° de latitude Nord, le territoire de la Wilaya de Ghardaïa s'inscrit exclusivement dans l'espace saharien (dorsale du M'Zab, Hamada, Grand Erg Occidental,...).

La Wilaya de Ghardaïa est limitée :

- Au Nord par les wilayas de Laghouat et de Djelfa ;
- A l'Est par la wilaya de Ouargla ;
- Au Sud par la wilaya de Tamanrasset ;
- A l'Ouest par les wilayas d'El Bayadh et d'Adrar

La vallée du M'Zab été toujours considérée comme partie intégrante d'un agro-système, reposant sur le triptyque eau/habitat/palmeraie. Cette vallée se situe à 600 km au sud d'Alger dans la wilaya de Ghardaïa. Elle s'étend du Nord au Sud sur environ 450 km et d'Est en Ouest sur environ 200 km. Elle est délimitée au Nord par la wilaya de Laghouat, au Nord-Est par la wilaya de Djelfa, à l'est par la wilaya d'Ouargla, au Sud par El-Menia, au Sud-Ouest par Metlili, à l'Ouest par la wilaya d'El Beyadh (Figure 6).



Figure 6: Une carte montrant la wilaya de Ghardaïa au niveau de l'Algérie et le site d'échantillonnage au niveau de la vallée du M'Zab

1.1. Matériel biologique

1.1.1. Présentation de la plante étudiée

L'espèce *Phragmites communis* a été retenue pour l'isolement des bactéries de la rhizosphère (Figure 7).



Figure 7: Photo de *Phragmites communis* dans son aire d'origine

La *Phragmites communis* est une herbe vivace vasculaire probablement la plus répandue dans le monde (Matoh et al., 1988). On la trouve sur tous les continents. C'est une plante qui affectionne particulièrement les milieux humides non boisés, mais elle peut aussi croître sur sol sec. On la trouve surtout dans les marais ou les canaux de drainage (Haslam, 1972).

Cette plante vivace peut atteindre une grande taille (plus de 6 m) et former des groupements de tiges particulièrement denses pouvant contenir jusqu'à 325 tiges par mètre carré (Mal and Narine, 2004).

Les racines de cette plante est composé d'un système interconnecté et ramifié de rhizomes. Ces rhizomes sont couverts par une couche brunâtre de tissu foliaire effrayant et détaché et produire des racines et des pousses aériennes à partir des nœuds (Sangster, 1983).

1.1.2. Généralités

Le phragmite australis se plait dans les lieux marécageux. Elle produit de longues feuilles sur des tiges robustes. Ses épillets sont regroupées en panicules plumeuses brunâtres, qui se propage grâce à des stolons longuement rampants et des rhizomes traçants, mais aussi par graines à dispersion dans le vent.

Le roseau commun est probablement la plante vasculaire la plus répandue dans le monde. On la trouve sur tous les continents (sauf en Antarctique) et dans presque tous les biomes, à l'exception de la toundra arctique et des forêts équatoriales pluvieuses. C'est une plante qui affectionne particulièrement les milieux humides non boisés, mais elle peut aussi croître sur sol sec. On la trouve surtout dans les marais ou les canaux de drainage où le niveau d'eau ne dépasse guère un à deux mètres au-dessus de la surface du sol (Haslam, 1972)

Cette plante vivace peut atteindre une grande taille (plus de 6 m) et former des colonies particulièrement denses pouvant contenir jusqu'à 325 tiges par mètre carré (Mal and Narine 2004). Les tiges, dont le diamètre varie de 4 à 10 mm, sont produites à chaque printemps, mais elles meurent à la fin de l'automne. Elles demeurent toutefois érigées en hiver. La mort annuelle des tiges aériennes crée une litière qui se décompose lentement qui peut atteindre plusieurs centimètres d'épaisseur. Cette litière peut nuire à la croissance des autres plantes en bloquant la lumière et l'accès au sol pour les semences (Lavoie, 2008).

La biomasse de roseau commun atteint son maximum de juillet à septembre. Les jeunes pousses commencent à émerger d'Avril à Mai et se développent pendant l'été (Haslam, 1972). Le taux de croissance semble linéaire et son diamètre varie peu au cours de son développement (Hara et al., 1993 ; Debit, 2015).

Selon Rodwell (1995), une grande partie de la variation morphologique est l'adaptation phénotypique, perpétuée dans les populations clonales, mais au moins deux sous-espèces sont reconnues. Le type eurasiatique typique est généralement connu sous le nom de subsp. *australis* tandis que la forme indigène d'Amérique du Nord, autrefois appelée *P. berlandieri*, est maintenant connue sous le nom de subsp. *americanus*.

1.1.3. Classification de *Phragmites communis*

Phragmites communis est une plante de l'ordre de Poales et la a sous-famille d'Arundinoideae.

- **Domaine** : [Biota Règne : Plantae Haeckel, 1866](#)
- **Sous-Règne** : [Viridaeplantae](#)
- **Infra-Règne** : [Streptophyta John, Williamson & Guiry, 2011](#)
- **Classe** : [Equisetopsida C.Agardh, 1825](#)
- **Clade** : [Tracheophyta Sinnott ex Cavalier-Smith, 1998](#)
- **Clade** : [Spermatophyta](#)
- **Sous-Classe** : [Magnoliidae Novák ex Takht., 1967](#)
- **Super-Ordre** : [Lilianaes Takht., 1967](#)
- **Clade** : [Commelinids](#)
- **Ordre** : [Poales Small, 1903 Famille : Poaceae Barnhart, 1895](#)
- **Sous-Famille** : [Arundinoideae Kunth ex Beilschm., 1833](#)
- **Tribu** : [Molinieae V.Jirásek, 1966](#)
- **Sous-Tribu** : [Moliniinae Ohwi, 1941](#)
- **Genre** : [Phragmites Adans., 1763](#)
- **Espèce** : [Phragmites australis \(Cav.\) Trin. ex Steud., 1840](#)
- **Sous-Espèce** : [Phragmites australis \(Cav.\) Trin. ex Steud., 1840 subsp. australis](#)
- **Sous-Espèce** : [Phragmites australis subsp. chrysanthus \(Mabille\) Soják, 1982](#)

1.2. Matériel non biologique

Appareillage

Voir Annexe 1

Produits chimiques et milieux de culture

Voir Annexe 2

1.3. Echantillonnage

Les prélèvements des différents échantillons des sols rhizosphériques de *Phragmites communis* des sites choisis ont été effectués par M. Bakelli Aissa. L'échantillonnage consistait à prélever trois plants robustes, d'une apparence saine. Les systèmes racinaires ont été en premier lieu secoués vigoureusement pour enlever les grosses particules du sol attachées et puis ils ont été mis séparément dans des sachets stériles préalablement étiquetés en vue d'être transportés le jour même au laboratoire de microbiologie (Université de Ghardaia).

1.4. Isolement des bactéries endophytes

L'isolement des bactéries présentes dans le sol rhizosphérique de *Phragmite communisa* été effectué, sur le milieu TSA (Annexe 2) additionné de 50 mg/l de la poudre de nystatin.

La méthode d'ensemencement utilisée est celle des suspensions-dilutions (Rapilly, 1968). La suspension-mère est préparée par addition de 1 g de sol rhizosphérique de chaque échantillon (au total 9 échantillons) dans 9 ml d'eau distillée stérile (dilution notée 10^{-1}). À partir de cette suspension, plusieurs autres dilutions (10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} et 10^{-5}) sont préparées. Un volume de 100 μ l de chacune des dilutions est ensemencé sur le milieu d'isolement par étalement à raison de 2 répétitions par dilution. Les boîtes, ainsi ensemencées, sont mises à incuber dans une étuve à $30\pm 2^{\circ}\text{C}$ pendant 3 à 7 jours.

1g d'échantillon de sol (traités ou non traités)

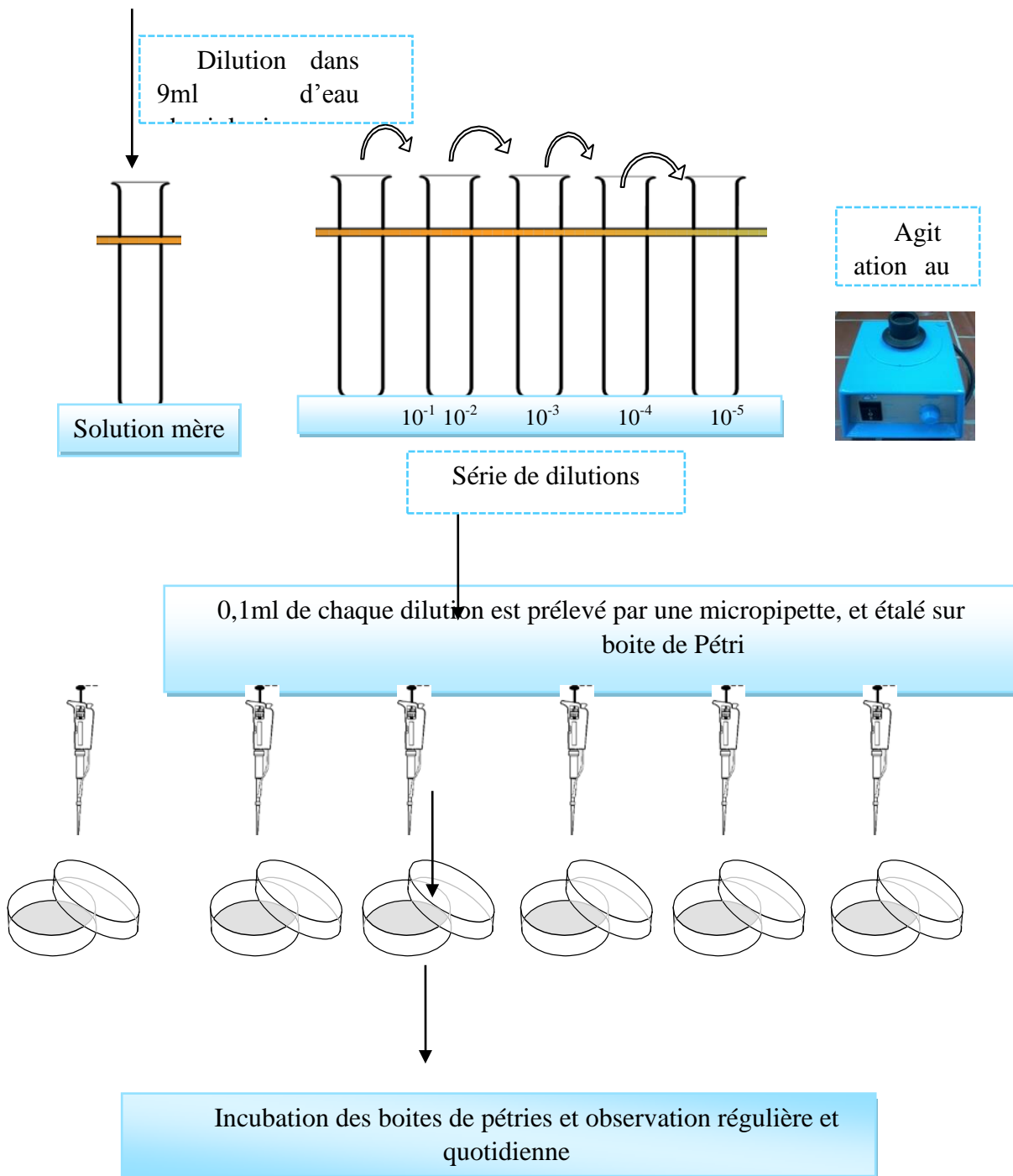


Figure 8: Etapes suivies pour l'isolement des souches à partir d'échantillons de sol

À la fin de la période d'incubation, les bactéries qui présentent des caractéristiques macro et micro-morphologiques ressemblantes et différentes sont sélectionnées pour la purification. Toutes les colonies montrant des caractéristiques morphologiques distinctes ont été repiquées et dans le cas des colonies identiques morphologiquement et abondantes sur le milieu d'isolement nous avons repiqué deux colonies pour chaque morphotype. Les isolats (colonies) sélectionnés sont codés puis prélevés délicatement à l'aide d'une pipette Pasteur pour être ensemencé sur le milieu TSA et incubé à $28 \pm 2^\circ\text{C}$ pendant 3j.

1.5. Identification des isolats bactériens

Les isolats obtenus ont fait l'objet d'une identification morphologique macroscopique et microscopique.

1.5.1. Examen macro-morphologique

Les isolats ainsi poussant sur le milieu TSA sont observés directement à l'œil nu. L'examen macroscopique des cultures bactériennes est le premier examen effectué après l'isolement, il consiste à observer directement, à l'œil nu, l'aspect morphologique des colonies obtenues sur milieu GN après 24 à 48 heures d'incubation en tenant compte des critères suivants :

- ✓ La taille des colonies : par mesure de diamètre.
- ✓ La forme des colonies : circulaire, filamenteuse, irrégulière, ronde, étoilée, etc.
- ✓ Le relief : plane, élevée, convexe, bombée, bossue, volcanique, etc.
- ✓ Le bord : régulier, ondulé, lobé, dentelé, filamenteux, bouclé, etc.
- ✓ L'aspect : duveteux, poudreux, granuleux, etc.
- ✓ La consistance : molle, élastique, cartonnée, rigide, etc.
- ✓ La couleur de la culture (colonie).
- ✓ L'opacité : les colonies sont soit opaques et ne laissent pas passer la lumière, translucides en laissant passer la lumière mais on ne voit pas les formes au travers ou transparentes (laissent passer la lumière et voir les formes au travers) (Ripert, 2013).

1.5.2. Examen micro-morphologique

Les isolats obtenus sont observés sous un microscope photonique à l'état frais pour déterminer la mobilité et après la réalisation de la coloration de Gram.

Une suspension bactérienne est étalée sur une lame en verre propre, puis séchée et fixée à la flamme. La lame est recouverte pendant une minute par le réactif N°1 (violet de Gentiane), puis lavée doucement à l'eau. La préparation est ensuite recouverte par le réactif N°2 (une solution de Lugol) pendant une minute, et de même lavée doucement à l'eau. Le réactif N°3 (50% alcool absolue et 50% acétone) est ajouté, par la suite, pour la décoloration. Enfin, après recouvrement de la lame par le réactif N°4 (la fushine) pendant une minute, un lavage doux avec de l'eau pure est réalisé avant séchage de la lame, puis, une observation au microscope (Objectif $100 \times$ à l'huile d'immersion) est effectuée. Avec cette coloration double, les bactéries « Gram positif » apparaissent en violet foncé tandis que les bactéries « Gram négatif » sont colorées en rose ou en rouge (Tifrit et Mohamed, 2016).

1.6. Screening de l'activité favorisant la croissance des plantes (PGPB)

1.6.1. Fixation d'azote

L'activité de fixation de l'azote testée sur des milieux NFb (Dobereiner, 1980) contenant de l'acide malique. L'activité de fixation de l'azote a été testée sur des milieux semi-solides et solides. Les isolats bactériens ont été testés auparavant en milieu solide contenant 0,5 % de bleu de bromothymol comme indicateur de pH. Les colonies colorées en bleu ont été considérées comme positives pour la fixation de l'azote atmosphérique. Les résultats positifs ont été confirmés après inoculation sur un tube contenant du NFb semi-solide et incubation à 30 ± 2 °C pendant 7 jours. Les souches qui ont formé une pellicule ont été considérées comme positives pour la fixation de l'azote.

1.6.2. Solubilisation du phosphate inorganique

La capacité de solubilisation du phosphate a été évaluée à l'aide de la gélose NBRIP (Nautiyal, 1999). Après 48 h à 72 h d'incubation à 30 ± 2 °C, l'indice de solubilisation du phosphate a été calculé en divisant la zone de solubilisation du phosphate sur la gélose NBRIP par le diamètre de croissance de la tâche d'inoculant. Pour l'estimation quantitative de la solubilisation du phosphate inorganique par les isolats, la méthode développée par Pikovskaya (1948) a été utilisée. Après 10 jours d'incubation à 30 ± 2 °C. dans le milieu liquide de Pikovskaya, la concentration du phosphate soluble a été estimée à partir du surnageant par la méthode du chlorure stanneux (King, 1932).

1.6.3. Solubilisation du potassium

Pour tester la capacité de solubilisation du potassium, des isolats rhizosphériques de *Phragmites communis* ont été transférés dans le milieu d'Aleksandrov et incubés à 30 ± 2 °C pendant 48 h (Aleksandrov et al., 1967). Les souches qui ont formé une zone claire autour des colonies ont été considérées comme des bactéries solubilisantes K inorganiques.

1.6.4. Production de l'acide indole acétique (AIA)

L'estimation qualitative de la production de l'AIA a été réalisée en utilisant la méthode décrite par Chang et al. (2014), avec des modifications mineures. Les isolats bactériens ont été cultivés dans un milieu Luria Bertani additionné de L-tryptophane ($500 \mu\text{g mL}^{-1}$). Après 4 jours d'incubation à 30 ± 2 °C, le milieu a été centrifugé et 2 ml de surnageant ont été mélangés avec 4 ml de réactif de Salkowski (contenant 150 ml de H_2SO_4 pur, 250 ml de H_2O et 75 ml de $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ 0,5 M) et 150 μl d'acide phosphorique 10mM (H_3PO_4). Le mélange obtenu a été incubé à température ambiante dans l'obscurité pendant 25 minutes. Le développement d'une couleur rose indique la production de l'AIA. Ensuite, la densité optique a été mesurée à 530 nm (Szymanska et al., 2015).

1.6.5. Production d'auxine

La capacité de production d'auxine par les souches bactériennes a été testée selon la technique décrite par (Gupta, Meena et al. 2014). A partir de la culture liquide de chaque souche, 25 µL ont étéensemencés dans 4 mL de milieu Luria Bertani supplémenté avec 1 g de tryptophane. Après 48 h d'incubation à température ambiante, 2 mL de la culture liquide ont été centrifugés à 8000 rpm pendant 10 mn. Un millilitre du surnageant a été mélangé à 2 mL du réactif de Salkowski et exposé à l'obscurité pendant 30 mn. Pour chaque isolat, trois répétitions ont été faites. La production d'auxine est révélée par une coloration rose du mélange dont l'intensité de cette coloration a été mesurée au spectrophotomètre à une longueur d'onde de 530 nm. Une estimation de cette production d'auxine a été effectuée par comparaison à une courbe standard établie à partir d'une solution mère d'auxine (Ndiaye et al., 2020).

1.6.6. Activité de la phytase (minéralisation du phosphate organique)

Les isolats ont été testés pour leur capacité à produire de la phytase sur un milieu solide (Idriss et al., 2002). Les boîtes ont été repérées par 1µL de la suspension bactérienne et incubées à 30°C pendant 3 jours. Les isolats avec une zone translucide autour de la colonie ont indiqué une production extracellulaire de phytase

1.6.7. Production d'ammoniac

Pour la production d'ammoniac, tous les isolats bactériens ont été inoculés dans un milieu à base de peptone contenant 1 ml d'Eppendorf et incubés pendant 48 h à 30 ± 2 °C. Après la croissance bactérienne, le réactif de Nessler (0,5 ml) a été ajouté au tube dans un rapport de 2:1. Le développement de la couleur brune à jaune a été enregistré comme une réaction positive pour la production d'ammoniac. La densité optique a été mesurée à 450 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (Cappucino et Sherman, 1992). La concentration d'ammoniac a été estimée à l'aide de la courbe standard du sulfate d'ammonium.

1.6.8. Production de sidérophores

La production de sidérophores par des isolats bactériens a été réalisée selon la méthode de Kumari et al. (2018) sur des boîtes de gélose au chrome azurol S après inoculation de 1µl de suspension bactérienne. Après incubation à 30 ± 2 °C pendant 4-5 jours, les isolats présentant un halo orange autour des colonies ont été considérés comme positifs pour la production de sidérophores.

1.6.9. Production d'HCN

La production de HCN par des isolats bactériens a été testée selon le protocole décrit par Lorck (1948). Ce protocole consistait à inoculer des cultures bactériennes sur un milieu TSA additionné de 4,4 g/L de glycine. La production de cyanure a été détectée à l'aide de bandes de papier Whatman imprégnées de picrate/Na₂CO₃. Ces bandes ont été fixées sur la face inférieure du couvercle de la boîte. Ces boîtes ont été scellées avec du Parafilm et incubées en position inversée à 30 ± 2 °C pendant 4 jours. Le développement de la couleur orange sur le papier Whatman indiquait la production de HCN.

1.6.10. Production d'enzymes

(a) Détermination de l'activité protéolytique

L'activité protéolytique a été testée sur le milieu de SKM (Annexe) (Loper et Schroth, 1986). Après incubation à 30 ± 2 °C pendant 24 heures, les plaques ont été examinées pour le développement de halos clairs autour des colonies bactériennes.

(b) Détermination de l'activité chitinasique

L'activité de la chitinase a été testée en repérant 1 μ L de suspension bactérienne sur des plaques de gélose à la chitine (Woo et Park, 2003) et incubée pendant 3 jours à 30 ± 2 °C. La présence d'une zone claire autour des spots indique l'activité de la chitinase.

(c) Production d'ACC-désaminase

Sur la base de la méthode modifiée de Glick et al. (1995), tous les isolats bactériens ont été soumis à un test de dépistage de l'activité de la 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) désaminase sur un milieu minimal contenant 3 mM d'ACC comme seule source d'azote. Si la croissance de l'isolat était enregistrée après 2 jours d'incubation à 30 ± 2 °C, l'activité de l'ACC désaminase était considérée comme positive.

(d) Activité amylolytique

La capacité de dégradation de l'amidon a été testée sur un milieu de gélose nutritive enrichi de 0,5 % d'amidon soluble. L'inoculation de la culture bactérienne a été réalisée par spot (1 μ l) (Mukhtar et al., 2019). Des suspensions de cultures bactériennes fraîches ont été repérées sur le milieu et incubées à 30 ± 2 °C pendant 48 h. La solution de réactif colorant (0,254 g d'iode et 4,0 g de potassium iodure en 1 L) ont été versés sur la surface du milieu et l'apparition d'un halo clair autour des colonies indique une activité amylolytique positive de la souche.

(e) Activité cellulolytique

L'activité de la cellulase a été évaluée quantitativement à l'aide de la méthode décrite par Berg et Pettersson (1977). En bref, les isolats ont été repérés dans un milieu solide contenant 10 g/L de carboxyméthylcellulose (CMC) comme seule source de carbone et incubés pendant 7 jours à 30 ± 2 °C.

(f) Production de la pectinase

La production des pectinases a été recherchée sur le milieu M9 additionné de 10g/l de pectine et de 1.2g/l d'extrait de levure. La souche microbienne est ensemencée par touche sur le milieu spécifique (M9) à l'aide d'une anse stérile. Après incubation à 28°C pendant 48h, la surface de la culture microbienne est inondée par une solution de bleu de toluidine 0.1%. La présence de zones claires entourant la croissance bactérienne traduit la production de la pectinase par les souches bactériennes (Smibert, 1994).

Chapitre III: Résultats et Discussion

III. Résultats et discussion

1. Isolement et caractérisation des souches isolées

Les résultats du dénombrement des souches bactériennes isolées à partir du sol rhizosphérique de *Phragmites communis* sont mentionnés dans le Tableau 1.

Tableau 1: Dénombrement bactéries rhizosphériques isolées.

Concentration du sel	Densité bactérienne (Ufc/m)
0%	17.10 ⁴
3%	1.10 ⁴
6%	45.10 ⁴
10%	75.10 ⁴

L'analyse des résultats obtenus de l'isolement des bactéries rhizosphériques montre que le nombre de bactéries est important dans le sol rhizosphérique. Des bactéries ont été trouvées au niveau de toutes les concentrations en sel utilisées (de 0 à 10%).

Cette forte abondance en bactéries peut s'expliquer par les relations bénéfiques existantes entre la plante et le microorganisme dans le sol.

Les microorganismes de la rhizosphère peuvent contribuer au recyclage des éléments dans la rhizosphère pour en faire des nutriments assimilables par la plante (Van der Heijden et al., 1998 ; Vogelsang et al., 2006) ; la production d'hormones végétales (Dobbelaere et al., 1999 ; Van Loon et al., 1999 ; Patten et Glick, 1996) ou encore la protection contre les pathogènes (Landa et al., 2003).

1.1. Etude microbiologique des bactéries rhizosphériques isolées

1.1.1. Caractérisation morphologique

Nous avons pu isoler et purifier 26 souches bactériennes à partir du sol rhizosphérique de *Phragmites communis* analysé. En se basant sur les résultats de la coloration de Gram, nous notons la dominance des bactéries Gram+ (24 souches) par rapport aux bactéries Gram- (2 souches seulement).

1.2. Etude micro-morphologique

L'étude macroscopique des isolats bactériens obtenus dans le cadre de cette étude en se basant sur les différents caractères des colonies bactériennes tel que : la forme, la taille, l'élévation, l'opacité, la consistance et la couleur est donnée dans le Tableau 2.

Tableau 2: Résultats de l'aspect macroscopique des bactéries rhizosphériques isolées.

Code de l'isolat	Forme	Taille	Elévation	Opacité	Consistance	Couleur
PE1	Ronde	5-7mm	Convexe	Opaque	Lisse	Blanche
PE2	Ronde	5-7mm	Convexe	Opaque	Lisse	Blanche
PE3	Ronde	5-7mm	Convexe	Opaque	Lisse	Blanche
PE4	Ronde	5-6mm	Convexe basse	Opaque	Lisse	Beige
PE5	Ronde	5-7mm	Convexe	Opaque	Lisse	Blanche
PE6	Irrégulière	3-4mm	Convexe basse	Opaque	Lisse	Orangé-roséte
PE7	Irrégulière	3-4mm	Convexe basse	Opaque	Lisse	Orangé-roséte
PE8	Ronde	7-8mm	Convexe	Opaque	Crémeuse	Blanche
PE9	Ronde	~ 20mm	Elevé	Transpar ente	Crémeuse	Blanche
PE10	Irrégulière	~20m	Elevé	Transpar ente	Crémeuse	Blanche
PE11	Ronde	10- 15mm	Convexe	Transpar ente	Crémeuse	Blanche
PE12	Ronde	10- 15mm	Convexe	Transpar ente	Crémeuse	blanche
PE13	Rhizoïde	5-8mm	Convexe	Opaque	Crémeuse	Blanche
PE14	Rhizoïde	5-8mm	Convexe	Opaque	Crémeuse	Blanche
PE15	Rhizoïde	5-8mm	Plane	Opaque	Crémeuse	Blanche
PE16	Rhizoïde	5-8mm	Plane	Opaque	Crémeuse	Blanche
PE17	Rhizoïde	5-8mm	Convexe	Opaque	Crémeuse	Blanche
PE18	Irrégulière	2-4mm	Convexe	Opaque	Lisse brillant	Beige
PE19	Ronde	2-4mm	Convexe	Opaque	Lisse brillant	Beige
PE20	Ronde	2-4mm	Plane	Opaque	Lisse brillant	Beige
PE21	Irrégulière	2-4mm	Convexe	Opaque	Lisse brillant	Blanche
PE22	/	2-4mm	/	Opaque	Lisse brillant	Blanche
PE23	/	6- 10mm	/	Transpar ente	Lisse	/
PE24	/	6- 10mm	/	Transpar ente	Lisse	/
PE25	Irrégulière	6- 10mm	Convexe	Transpar ente	Lisse	Blanche
PE26	Ronde	6- 10mm	Convexe	Transpar ente	Lisse	Blanche

Ces bactéries ont été regroupées dans des groupes morphologiques qui se ressemblent (Figure 9).



Figure 9: Deux photos montrant les bactéries rhizosphériques regroupées dans des groupes morphologiques

- Examen microscopique

Des observations microscopiques ont été réalisées après la réalisation de la coloration de Gram pour les représentants des groupes morphologiques obtenus dont les résultats sont regroupés dans le Tableau 3.

Tableau 3: Aspect microscopique des représentants des bactéries obtenus.

Souche	Gram	Forme	Mobilité	Mode Regroupement	De Formation Des Spores
PE1	-	coccobacille	+	En chaînette	-
PE3	-	Bacille	++	En deux et en chaînette	-
PE4	+	Bacille grand taille	-	En deux et en chaînette	+
PE5	-	Bacille	++	En deux et en chaînette	-
PE7	-	Coccobacille	+	En chaîne	-
PE9	-	Cocci	-	En ama et en chaînette	-
PE10	+	Bacille grand taille	-	En chaînette	+
PE12	-	Bacille	++	En deux et en chaîne	-
PE15	+	Bacille	-	En chaînette	+
PE18	+	Bacille grand taille	-	En chaînette	+
PE19	-	coccobacille	+	En chaînette	-
PE20	+	Bacille	-	En chaînette	+
PE23	+	Bacille grand taille	-	En chaînette	+
PE25	+	Bacille grand taille	-	En chaînette	+
PE26	-	cocci/coccobacille	-	En ama	-

Les bactéries à Gram positif et à Gram négatif sont très répandues dans l'environnement et particulièrement dans la rhizosphère qui représente un carrefour d'échange de nutriments entre les plantes et les microorganismes du sol.

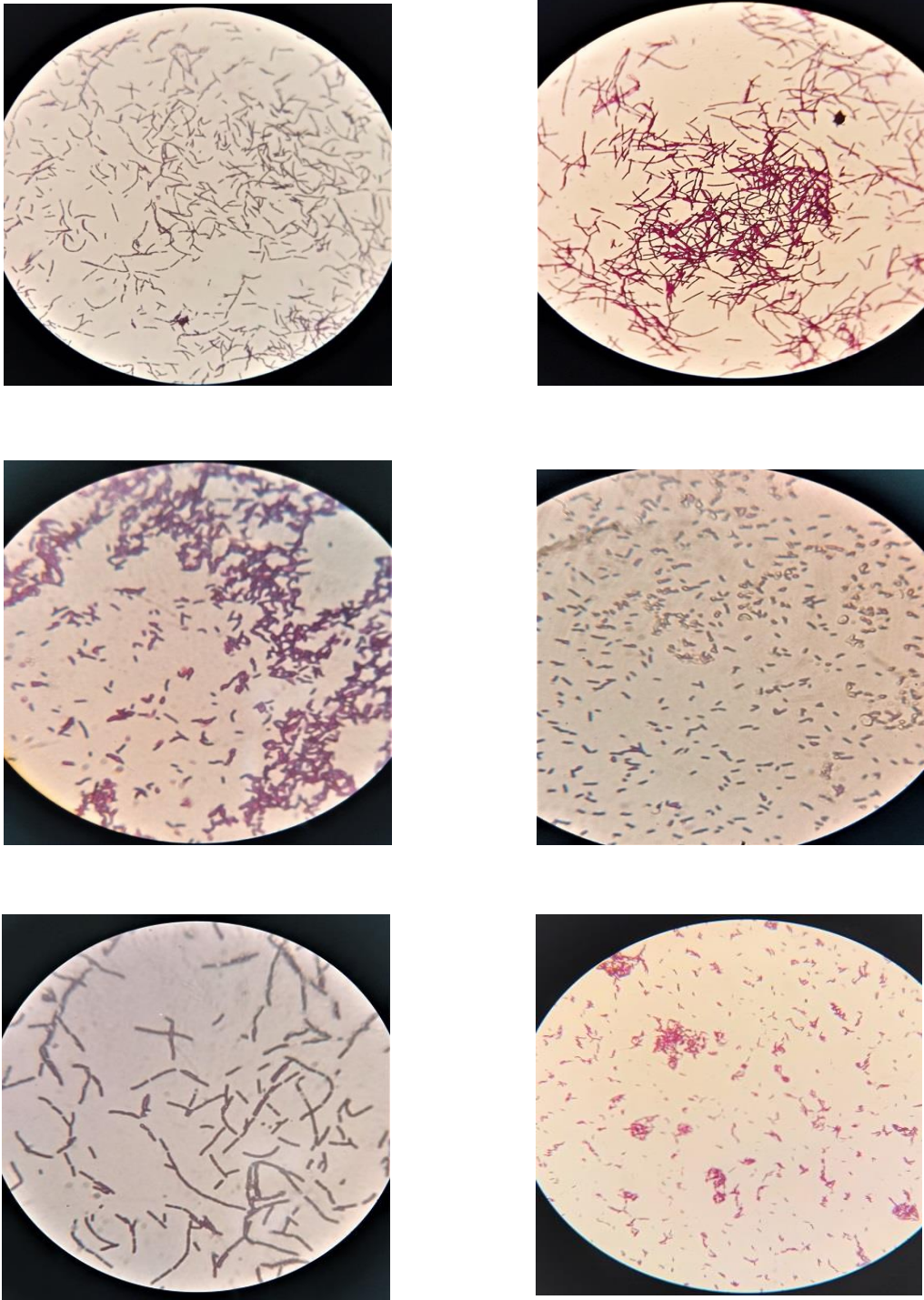


Figure 10: Quelques photos montrant l'aspect microscopique des représentants des bactéries obtenus

Les bactéries à Gram positif et à Gram négatif sont très répandues dans l'environnement et particulièrement dans la rhizosphère qui représente un carrefour d'échange de nutriments entre les plantes et les microorganismes du sol.

2. Evaluation du pouvoir PGPB des bactéries rhizosphériques isolées

Nous avons évalué les potentialités PGPB des souches bactériennes isolées de la rhizosphère de la plante *Phragmites communis* par les différentes méthodes décrites dans la partie matérielle et méthode. L'ensemble des résultats obtenus sont mentionnés dans le tableau ci-dessous (Tableau 4).

Sur les 26 bactéries isolées de la rhizosphère, la majorité des isolats bactériens ont présenté au moins une activité PGPB.

Tableau 4: Tableau présenté le résultat globale d'analyse d'activité PGP.

SE	NFB	Solubilisation de P (µg/ml)		K	CAS	CaCO ₃	CE L	AMY	SKM	Production d'NH ₃ (µg/ml)	GE L	HCN	Phytase	ACC	AIA (µg/ml)
		Pikovskaya	NRBIP												
PE1	-	0,023	-	-	-	-	2	+	+	64,09	+	+++	-	+	0,0
PE2	-	0,07	-	-	-	-	2	+	+	106,30	+	+++	-	+	0,0
PE3	-	0,06	-	-	-	-	2	+	+	100,59	-	-	-	+	39,9
PE4	-	0,0	-	-	-	-	2	+	+	100,59	-	-	-	-	174,5
PE5	-	0,031	+	-	-	-	2	+	+	114,87	-	-	-	+	30,8
PE6	-	0,0	-	-	-	-	2	+	+	42,01	-	-	-	-	0,0
PE7	-	0,01	-	-	-	-	2	+	+	64,87	-	+++	-	+	0,0
PE8	-	0,013	-	-	-	-	2	+	+	47,01	+	++	-	+	0,0
PE9	++	0,015	-	-	-	-	2	+	+	53,44	+	-	-	-	101,7
PE10	-	0,013	-	-	-	-	0	+	-	89,87	+	-	-	+	0,0
PE11	+++	0,0	-	-	-	-	0	+	+	84,87	+	-	-	+	0,0
PE12	+	0,075	+	+	-	+	12	+	-	99,16	-	-	-	-	39,9
PE13	-	0,005	-	-	-	-	2	+	-	122,01	-	-	-	-	0,0
PE14	-	0,0	-	-	-	-	2	+	+	6,56	+	-	-	-	0,0
PE15	-	0,0	-	-	-	-	2	+	+	20,84	-	-	-	-	0,0
PE16	-	0,0	-	-	-	-	2	+	+	13,70	-	-	-	-	0,0
PE17	+	0,0	+	-	-	-	2	+	+	7,73	+	+	+	-	0,0
PE18	-	0,0	-	-	-	-	2	+	-	108,44	-	-	-	-	0,0
PE19	+	0,0	-	-	-	-	0	+	-	106,30	-	-	++	-	0,0
PE20	+	0,014	+	-	-	-	0	+	-	55,59	+	-	-	+	45,6
PE21	+	0,0	-	-	-	-	0	+	-	41,30	+	-	-	+	0,0
PE22	+	0,0	-	-	-	-	0	+	-	59,16	-	-	-	-	0,0
PE23	+	0,0	-	-	-	-	0	+	-	54,87	+	-	-	-	0,0
PE24	++	0,0	-	-	-	-	0	+	-	61,30	+	+	-	-	0,0
PE25	+	0,0	-	-	-	-	0	+	-	84,87	+	-	-	-	0,0
PE26	+	0,0	-	-	-	-	0	+	-	77,01	+	-	-	-	0,0

3. Discussions générale

Le présent travail porte sur l'isolement et l'identification des bactéries endo-sphériques manifestant une activité PGP et promotrices de la croissance des plantes *Phragmites communis*.

Les résultats obtenus ont montré que les sols étudiés sont légèrement salin, présentant des teneurs importantes en matière organique, favorisant ainsi la prolifération de la microflore. Des bactéries ont été trouvées au niveau de toutes les concentrations en sel trouvées.

Cette forte abondance en bactéries peut s'expliquer par les relations bénéfiques existantes entre la plante et le microorganisme dans le sol.

Plusieurs études ont montré que l'adaptation des plantes sahariennes à leur milieu est guidée par une diversité génétique des microorganismes qui leur sont étroitement associés (Hinsinger et al., 2006).

Au total, 26 isolats bactériens ont été sélectionnés sur la base de leurs critères phénotypiques sur gélose TSA, à savoir : la forme, la taille, la couleur et l'aspect des colonies obtenues après incubation à 30°C/ 24 à 48h.

La caractérisation phénotypique, l'observation macroscopique, microscopique et l'identification biochimique des souches isolées, sélectionnées promotrices de croissance du plant (PE1, PE2, PE3, PE5, PE8, PE9, PE11, PE12 et PE26) ont montré des colonies blanches, rondes et des bacilles à Gram positifs et négatifs, mobiles avec l'appartenance au genre de *Bacillus*.

Wipat et Harwood, (1999) ont rapporté sur l'abondance du genre de *Bacillus subtilis* dans la rhizosphère, isolée à partir de nombreuses espèces végétales à une concentration de 10⁷ par gramme de sol.

La majorité des espèces distribuées et répandues telles que *B. subtilis* et *B. cereus* sont caractérisées par leur pouvoir de lutte contre les pathogènes des plantes (Stabb et al., 1994). Nihorimbere et al. (2011) ont suggéré que la mobilité des bactéries constitue un trait important des PGPR, permettant l'atteinte de la surface des racines.

L'effet PGPR offre des possibilités intéressantes en bio-agronomie. Mais avant de passer à l'application, il est nécessaire de s'intéresser à l'étude des mécanismes bénéfiques de ces bactéries coopératives. Cette capacité inhérente à ces bactéries de stimuler la croissance des plantes est souvent liée à leurs aptitudes à solubiliser le phosphate insoluble, produire de l'AIA et à fixer de l'azote atmosphérique...etc (Charest, 2005 ; Sivasakthi, 2014 ; Glick, 1997).

Les bactéries diazotrophiques intervenant dans la fixation d'azote en échange avec le carbone libéré sous forme d'exsudats racinaires constituent un avantage majeur pour les plantes. De nombreux travaux réalisés par (Ding et al., 2005 ; Ding et al., 2005) qui ont rapporté sur l'application de diazotrophes libres, telles que *Bacillus* sp., dans l'augmentation des rendements accrus de diverses cultures et l'absorption élevée des éléments tels que le phosphore et l'azote dans les plantes inoculées (Araujo, 2008).

La fixation l'azote atmosphérique, est fortement liée à l'existence du gène *nif H* (Elo et al., 2001 ; Berge et al., 2002 ; Von der Weid et al., 2002) ont suggéré que les souches *Paenibacillus odorifer*, *Paenibacillus graminis*, *Paenibacillus peoriae* et *Paenibacillus brasiliensis* sont classées fixatrices d'azote.

Le phosphate est l'un des facteurs nutritifs les plus limitants de la croissance des plantes où la majorité des sols agricoles sont pauvres en phosphate assimilable et soluble (Vessey, 2003). Ce dernier, une fois ajouté au sol, est très réactif avec les autres composants du sol. Selon Sundara (2002), l'utilisation des microorganismes solubilisateurs de phosphate pourrait diminuer l'apport des fertilisants phosphatés de 25%.

La meilleure solubilisation des phosphates sur milieu de culture PKV est réalisée par deux souches isolées, sélectionnées promotrices de croissance de plante (PE2 et PE12).

Les résultats obtenus se concordent avec les travaux rapportés par Babana (2003), ce qui explique la libération des acides organiques dans le milieu de culture solide utilisé (Nautiyal, 1999 ; Babana, 2003 ; Komy, 2005).

Les concentrations de potassium soluble dans le sol sont généralement très faibles et plus de 90% du potassium dans le sol se présente sous forme de minéraux de roche et de silicate insolubles, la concentration en potassium soluble est généralement très faible dans le sol (Parmar et Sindhu, 2013). La carence en potassium est devenue une contrainte majeure dans la production agricole. Sans une concentration en potassium adéquate, des racines peu développées, une faible production de graines, un taux de croissance lent et un rendement plus faible sont enregistrés. Il est essentiel de trouver une source de potassium endémique alternative pour maintenir le statut en potassium et l'absorption par les plantes dans les sols pour maintenir la production végétale (Kumar et Dubey, 2012).

Les exsudats racinaires sont une source naturelle de L- tryptophane pour la microflorerhizosphérique (Dastager et al., 2010), ce dernier est considéré comme le précurseur de l'AIA, son addition au milieu favorise et augmente la synthèse de cette hormone (Glick, 1995). La synthèse de cet hormone est variable entre les souches de différentes espèces et concentration, il stimule la division et l'élargissement des cellules et des tissus, l'expansion des feuilles et aussi jouent un rôle majeur dans l'elongation racinaire (Egamberdieva, 2008 ; Maleki et al., 2010 ; Martínez Viveros et al., 2010).

Dans un autre ongle, de nombreux isolats sont capables de produire des sidérophores, représente un cas particulier de compétition pour les nutriments repose sur la compétition pour le fer. La capacité des sidérophores d'agir comme agents efficaces dépend de la plante cultivée, du phytopathogène spécifique à supprimer, de la composition du sol, de la bactérie productrice, et de l'affinité du sidérophore spécifique pour le fer.

La présence de l'ACC désaminase chez tous nos isolats est utilisée comme un outil pour la sélection des bactéries dans la promotion de la croissance des plantes sous différentes conditions environnementales difficiles. En effet, cette enzyme en réduisant les concentrations de l'éthylène endogène soulage la plante de plusieurs stress causés par les infections, la toxicité des métaux lourds, la salinité élevée et même la sécheresse, l'exposition aux métaux,

Les contaminants organiques et la prédation des insectes (Glick et al., 1998). Les résultats obtenus ont montré une production assez importante chez les souches isolées, sélectionnées promotrices de croissance de plante. Cependant, les souches (PE1, PE2, PE7 et PE8) se manifestent incapable de produire du HCN.

L'antibiose est le mécanisme plus utilisé dans la limitation de l'invasion de l'agent pathogène dans les tissus de la plante-hôte. Belabid et ses collaborateurs (2000) ont rapporté sur l'incidence accrue d'une flétrissure associée à *Fusarium oxysporum* f. sp. *lentis*, provoquant des pertes estimées entre 10 % -66%, en Algérie.

De nombreuses espèces du genre *Bacillus* sont capables d'exprimer une large gamme d'enzymes extracellulaires thermostables telle que les protéases, les lipases et les amylases (Sarethy et al., 2011).

Horikoshi (1971) a rapporté que les bactéries du genre *Bacillus* sp. ont manifesté la présence d'un système enzymatique, permettant la production des protéases alcalines. Par ailleurs, d'autres protéases alcalines stables à différentes conditions environnementales, sont purifiées à partir des espèces du genre *Bacillus* caractérisées et commercialisées (Schallmey et al., 2004; Kazan et al., 2005).

Les résultats obtenus montrent que presque tous les souches isolées, sélectionnées promotrices de croissance de plant, ont une activité protéolytique.

Conclusion

La nature saharienne diminue la croissance des plantes et l'activité photosynthétique cela se traduit par un déséquilibre en éléments nutritifs dans les plantes. Dans le cadre de ce études menées sur les plantes phragmites communis, l'utilisation de biotechnologie très rapide par l'identification de souches bactériennes efficaces dans l'amélioration de la croissance des plantes.

Pour notre part, nous avons porté notre attention sur les bactéries promotrices de la croissance des plantes (PGPR), un autre type de bactéries phytobénéfiques, qui utilisent les exsudats racinaires comme substrats nutritifs pour agir soit directement ou indirectement sur le développement de la plante.

L'objectif de ce travail était de sélectionner et d'identifier de souches selon leurs potentiels d'activité PGP: ayant principalement un rôle dans le biocontrôle protégeant ainsi les plantes des champignons phytopathogènes (ex : production de HCN), dans la biofertilisation (production des enzymes lytiques) et un rôle dans la biostimulation (productrices d'AIA). La première partie a été consacrée à l'isolement et l'identification de 46 souches bactérie endophytes, à partir de rhizoplan d'échantillons de *Phragmites communis* de la la wilaya de Ghargaia, ont été testées. des souches été identifié selon une approche phénotypique, morphologique, méthde de MALDI TOF et GC, permis de démontrer qu'il existait une diversité entre les bactéries présentes au de rhizoplan étudiées, en fane, nous avons déterminé parmi les 46 souches testées, celles qui ont la capacité de solubiliser la phytate, de produire l'auxine, fixation d'azote, production de ; production d'ACC, production d'HCN et la sécrétion des enzymes.

La seconde partie de notre travail expérimental qui s'est orientée vers la mise en évidence la présente de modes d'actions des PGPR, telque la fixationon d'azote, soulubilisation de phosphate et la prproduction de sédirophore Les souches plus parfèrment : pseudomonase lundensis, no organisme identéfié qui pouvant stimulé la croissance des plantes en jouant le rôle de biostimulateurs. D'autre parte la souche de *Pseudomonas aeruginosa* montré une activité antifongique vis-à-vis les phytopathogène.

Ce travail vise à sélectionner les bactéries qui ont des caractéristiques des PGPR, pour les inoculer ensuite avec le pante saharienne, afin d'étudier leur capacité à stimuler la croissance de ces pante et d'amélioré les paramètres de sa croissance. Ces souches, peuvent donc être plus en profondeur étudiées et valorisées, afin d'être utilisées en agriculture et en biotechnologie.

Références bibliographiques

- Abdesselam, N. (2017). Identifications et caractérisations des bactéries isolées à partir de différents sols. \.
- Ahemad, M. and M. Kibret (2014). "Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: current perspective." Journal of King Saud University-science**26**(1): 1-20.
- Alabouvette, C., C. Olivain, et al. (2006). "Biological control of plant diseases: the European situation." European Journal of Plant Pathology**114**(3): 329-341.
- Alori, E. T., B. R. Glick, et al. (2017). "Microbial phosphorus solubilization and its potential for use in sustainable agriculture." Frontiers in microbiology**8**: 971.
- Amarger, N. (2002). "Genetically modified bacteria in agriculture." Biochimie**84**(11): 1061-1072.
- Amina, M. Z. (2013). "Isolement des souches de *Pseudomonas* spp fluorescents rhizosphériques à partir de sol agricole et évaluation de leur rôle dans la croissance végétale et le biocontrôle des phytopathogènes."
- Andrews, J. H. and R. F. Harris (2000). "The ecology and biogeography of microorganisms on plant surfaces." Annual review of phytopathology**38**(1): 145-180.
- Andrews, S. C., A. K. Robinson, et al. (2003). "Bacterial iron homeostasis." FEMS microbiology reviews**27**(2-3): 215-237.
- Araujo, F. d. (2008). "Inoculação de sementes com *Bacillus subtilis*, formulado com farinha de ostras e desenvolvimento de milho, soja e algodão." Ciência e Agrotecnologia**32**(2): 456-462.
- Arnosti, C., K. Ziervogel, et al. (2009). "Enzyme activities in the water column and in shallow permeable sediments from the northeastern Gulf of Mexico." Estuarine, Coastal and Shelf Science**84**(2): 202-208.
- Arora, N. K., S. Tewari, et al. (2013). Multifaceted plant-associated microbes and their mechanisms diminish the concept of direct and indirect PGPRs. Plant microbe symbiosis: Fundamentals and advances, Springer: 411-449.
- Arzanesh, M. H., H. Alikhani, et al. (2011). "Wheat (*Triticum aestivum* L.) growth enhancement by *Azospirillum* sp. under drought stress." World Journal of Microbiology and Biotechnology**27**(2): 197-205.
- Ashrafuzzaman, M., F. A. Hossen, et al. (2009). "Efficiency of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) for the enhancement of rice growth." African Journal of Biotechnology**8**(7).
- Azevedo, J. L., W. Maccheroni Jr, et al. (2000). "Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants." Electronic Journal of Biotechnology**3**(1): 15-16.
- Babana, A. H. (2003). "Mise au point d'un inoculant biologique pour le blé irrigué du Mali."

- Baca, B. and C. Elmerich (2007). Microbial production of plant hormones. Associative and endophytic nitrogen-fixing bacteria and cyanobacterial associations, Springer: 113-143.
- Baldani, J., L. Caruso, et al. (1997). "Recent advances in BNF with non-legume plants." Soil biology and biochemistry**29**(5-6): 911-922.
- Barea, J.-M., M. J. Pozo, et al. (2005). "Microbial co-operation in the rhizosphere." Journal of experimental botany**56**(417): 1761-1778.
- Bashan, Y., M. E. Puente, et al. (1995). "Survival of *Azospirillum brasilense* in the bulk soil and rhizosphere of 23 soil types." Applied and environmental Microbiology**61**(5): 1938-1945.
- Béguin, P. and J.-P. Aubert (1994). "The biological degradation of cellulose." FEMS microbiology reviews**13**(1): 25-58.
- Belkadi, Z. and Y. Koliai (2016). Isolement de bactéries rhizosphériques à activité antagoniste et essai dans le biocontrôle de *Botrytis cinerea* sur la tomate, Université Mouloud Mammeri.
- Belnap, J., J. H. Kaltenecker, et al. (2001). "Biological soil crusts: ecology and management." US Department of the Interior, Bureau of Land Management, and National Science and Technology Center: Denver, CO.
- Belnap, J., S. L. Phillips, et al. (2004). "Response of desert biological soil crusts to alterations in precipitation frequency." Oecologia**141**(2): 306-316.
- Bergey's, M. (2010). Bacillus and Paenibacillus sp In: Plant Growth and Health Promoting Bacteria, .
- Bertrand, J. A., E. Fanchon, et al. (2000). "'Open' structures of MurD: domain movements and structural similarities with folylpolyglutamate synthetase." Journal of molecular biology**301**(5): 1257-1266.
- Bleecker, A. B. and H. Kende (2000). "Ethylene: a gaseous signal molecule in plants." Annual review of cell and developmental biology**16**(1): 1-18.
- Boukhalfa, H. and A. L. Crumbliss (2002). "Chemical aspects of siderophore mediated iron transport." Biomaterials**15**(4): 325-339.
- Boularas, H. and D. Selmane (2019). "Isolement et sélection de *Pseudomonas* spp. fluorescents performante résistante aux stress biotique et abiotique." **182**: 01.
- Bouthaina, E. A. O. and T. Ahlem (2017). "Effet de l'Apiros sur l'activité microbienne de la rhizosphère de *Pisum sativum* et isolement des bactéries endophytes."
- Bresson, J. (2013). Interaction plante-microorganismes: Implication de la rhizobactérie *Phyllobacterium brassicacearum* dans les réponses d'*Arabidopsis thaliana* au stress hydrique.

Bric, J. M., R. M. Bostock, et al. (1991). "Rapid in situ assay for indoleacetic acid production by bacteria immobilized on a nitrocellulose membrane." Applied and environmental Microbiology**57**(2): 535-538.

Burris, R. H. and G. P. Roberts (1993). "Biological nitrogen fixation." Annual review of nutrition**13**(1): 317-335.

Carrim, A. J. I., E. C. Barbosa, et al. (2006). "Enzymatic activity of endophytic bacterial isolates of *Jacaranda decurrens* Cham.(Carobinha-do-campo)." Brazilian Archives of Biology and Technology**49**(3): 353-359.

Céline, A. B. and B. A. Nawel (2017). Extraction et caractérisation de quelques molécules bioactives à partir des souches de *Pseudomonas fluorescens* et *Bacillus* sp de Biologie M'HAMED BOUGARA DE BOUMERDES

Chahrazed, O. (2017). "Effet PGPR de quelques *Streptomyces*. Impact sur les caractères morpho-biochimiques de la tomate *Lycopersicon esculentum*."

Chaihan, M. and S. Lumyong (2009). "Phosphate solubilization potential and stress tolerance of rhizobacteria from rice soil in Northern Thailand." World Journal of Microbiology and Biotechnology**25**(2): 305-314.

Cherif, H. (2018). Amélioration de la croissance du blé dur en milieu salin par inoculation avec *Bacillus* sp. et *Pantoea agglomerans* isolées de sols.

Chet, I. and L. Chernin (2003). "Biocontrol, microbial agents in soil." Encyclopedia of environmental microbiology.

Clayton, W. (1967). "Studies in the Gramineae: XIV." Kew Bulletin**21**(1): 111-117.

Coenye, T., D. Gevers, et al. (2005). "Towards a prokaryotic genomic taxonomy." FEMS microbiology reviews**29**(2): 147-167.

Cohen, A. C., C. N. Travaglia, et al. (2009). "Participation of abscisic acid and gibberellins produced by endophytic *Azospirillum* in the alleviation of drought effects in maize." Botany**87**(5): 455-462.

Compant, S., B. Reiter, et al. (2005). "Endophytic colonization of *Vitis vinifera* L. by plant growth-promoting bacterium *Burkholderia* sp. strain PsJN." Appl. Environ. Microbiol.**71**(4): 1685-1693.

Corbaz, R. (1990). Principes de phytopathologie et de lutte contre les maladies des plantes, PPUR presses polytechniques.

Curl, E. (1968). "Truelove (1986) The rhizosphere." Advanced series in agricultural science**15**.

Daoud, A. and S. Kreiri (2016). SOptimisation de la production de l'AIA par des rhizobactéries. BIOLOGIE, Abdelhamid Ibn Badis Mostaganem.

- Das, S. K. and A. Varma (2010). Role of enzymes in maintaining soil health. Soil enzymology, Springer: 25-42.
- Davet, P. (1996). Vie microbienne du sol et production végétale, Editions Quae.
- Debit, Z. (2015). "Caractérisation chimique du bois de chêne zéen (*Quercus canariensis* wild.) et du roseau commun (*Phragmites australis*): Dosage des polyphénols, mémoire master." Université Mouloud Mameri, Tizi-Ouzou: 13-34.
- Denis, F., E. Bingen, et al. (2007). "Bactériologie médicale Techniques usuelles. Elsevier Masson."
- Descy, J., C. Meex, et al. (2010). "Spectrométrie de masse maldi-toF en bactériologie clinique ou comment identifier une bactérie en une minute." Revue Médicale de Liège65(Suppl. Synthèse 2010): 29-34.
- Ding, Y., J. Wang, et al. (2005). "Isolation and identification of nitrogen-fixing bacilli from plant rhizospheres in Beijing region." Journal of applied microbiology99(5): 1271-1281.
- Djerdjouri, A. (2012). Activités de phytostimulation par les PGPR: cas de *Pseudomonas* et *Bacillus* en interaction avec la tomate et le haricot Biotechnologies Végétales, Ecole Nationale Supérieure Agronomique El-Harrach, Alger
- Dommergues, F. and F. Manganot (1970). "Les associations mycorrhiziennes." Ecologie Microbienne du sol. Ed Masson et Cie. Paris: 656-675.
- Dudeja, S., R. Giri, et al. (2012). "Interaction of endophytic microbes with legumes." Journal of basic microbiology52(3): 248-260.
- El-Komy, H. (2005). "Coimmobilization of *Azospirillum lipoferum* and *Bacillus megaterium* for successful phosphorus and nitrogen nutrition of wheat plants." Food Technology and biotechnology43(1): 19-27.
- Elad, Y. and A. Kapat (1999). "The role of *Trichoderma harzianum* protease in the biocontrol of *Botrytis cinerea*." European Journal of Plant Pathology105(2): 177-189.
- Feillet, P. (2000). Le grain de blé: composition et utilisation, Editions Quae.
- Garcia, J., M. Raimbault, et al. (1974). "Activités microbiennes dans les sols de rizières du Sénégal: relations avec les caractéristiques physico-chimiques et influence de la rhizosphère." Rev. Ecol. Biol. Sol11: 169-185.
- Garrity, G. M. (2005). "Systematic bacteriology." The Proteobacteria, Part C: The Alpha-, Beta-, Delta-, and Epsilonproteobacteria, Bergey's Manual Trust, Department of Microbiology and Molecular Genetics2.
- Gaur, A. (1990). Phosphate solubilizing micro-organisms as biofertilizer, Omega scientific publishers.

George, G. and J.-B. Baudin (2017). "La chromatographie en phase gazeuse: principe et exemples d'applications (1/2) " Site de ressources en chimie pour les enseignants. Retrieved 15/12/2017, 2017.

Gholami, A., A. Biyari, et al. (2012). "Growth promotion of maize (*Zea mays* L.) by plant-growth-promoting rhizobacteria under field conditions." Communications in soil science and plant analysis**43**(9): 1263-1272.

Glick, B. R. (1995). "The enhancement of plant growth by free-living bacteria." Canadian journal of microbiology**41**(2): 109-117.

Glick, B. R. (2012). "Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications." Scientifica**2012**.

Gobat, J.-M., M. Aragno, et al. (2003). "Le sol vivant, deuxième édition revue et augmentée." Les Presses Polytechniques et Universitaires Romandes, Lausanne: 568.

Govindasamy, V., M. Senthilkumar, et al. (2010). *Bacillus* and *Paenibacillus* spp.: potential PGPR for sustainable agriculture. Plant growth and health promoting bacteria, Springer: 333-364.

Grayston, S., D. Vaughan, et al. (1997). "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**(1): 29-56.

Grayston, S. J. and C. D. Campbell (1996). "Functional biodiversity of microbial communities in the rhizospheres of hybrid larch (*Larix eurolepis*) and Sitka spruce (*Picea sitchensis*)." Tree Physiology**16**(11-12): 1031-1038.

Gupta, G., S. S. Parihar, et al. (2015). "Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): current and future prospects for development of sustainable agriculture." J Microb Biochem Technol**7**(2): 096-102.

Gupta, S., M. K. Meena, et al. (2014). "Isolation, characterization of plant growth promoting bacteria from the plant *Chlorophytum borivilianum* and in-vitro screening for activity of nitrogen fixation, phosphate solubilization and IAA production." Int J Curr Microbiol Appl Sci**3**(7): 1082-1090.

Gutiérrez-Mañero, F. J., B. Ramos-Solano, et al. (2001). "The plant-growth-promoting rhizobacteria *Bacillus pumilus* and *Bacillus licheniformis* produce high amounts of physiologically active gibberellins." Physiologia Plantarum**111**(2): 206-211.

Han, J., L. Sun, et al. (2005). "Characterization of a novel plant growth-promoting bacteria strain *Delftia tsuruhatensis* HR4 both as a diazotroph and a potential biocontrol agent against various plant pathogens." Systematic and Applied Microbiology**28**(1): 66-76.

- Hanane, A. and A. Lamia (2018). Isolement de bactéries telluriques « PGPR » productrices de substances antifongiques et stimulatrices de la croissance des plantes. Microbiologie, A. MIRA - Bejaia.
- Hartmann, A., M. Rothballer, et al. (2008). "Lorenz Hiltner, a pioneer in rhizosphere microbial ecology and soil bacteriology research." Plant and soil**312**(1-2): 7-14.
- Haslam, S. M. (1972). "Biological flora of the British Isles. No. 128 *Phragmites communis* Trin.(*Arundo phragmites* L.,? *Phragmites australis* (Cav.) Trin." Journal of Ecology**60**: 585-610.
- Hazotte, A. (2016). Rôle de métabolites bactériens dans la mobilisation du césium d'une illite dopée: étude mécaniste et application à la phytoextraction.
- Helluy, S. and J. Holmes (2005). "Parasitic manipulation: further considerations." Behavioural processes**68**(3): 205-210.
- Heno Valencia, L. J. (2008). Etude des bases moléculaires de l'agrégation des sols par des exopolysaccharides bactériens, Grenoble 1.
- Hinsinger, P. (2010). "Les racines au cœur du fonctionnement de la rhizosphère." Alter Agri, Mai-Juin(101): 16-17.
- Hinsinger, P., C. Plassard, et al. (2006). "Rhizosphere: a new frontier for soil biogeochemistry." Journal of Geochemical Exploration**88**(1-3): 210-213.
- Holguin, G. and C. Patten (1999). Biochemical and genetic mechanisms used by plant growth promoting bacteria, World Scientific.
- Hugenholtz, P. (2002). "Exploring prokaryotic diversity in the genomic era." Genome biology**3**(2): reviews0003. 0001.
- Jeffries, P., S. Gianinazzi, et al. (2003). "The contribution of arbuscular mycorrhizal fungi in sustainable maintenance of plant health and soil fertility." Biology and fertility of soils**37**(1): 1-16.
- Jijakli, H. (2003). "La lutte biologique en phytopathologie." Phytopathologie: 289-317.
- Karima, A. (2018). Caractérisation de quelques modes d'action des PGPR chez 30 souches bactériennes isolées de la rhizosphère et le rhizoplan du blé dur. Biologie Et Ecologie Végétale, des Frères Mentouri Constantine 74.
- Kaur, J., B. S. Chadha, et al. (2007). "Purification and characterization of two endoglucanases from *Melanocarpus* sp. MTCC 3922." Bioresource Technology**98**(1): 74-81.
- Khakipour, N., K. Khavazi, et al. (2008). "Production of auxin hormone by fluorescent pseudomonads." Am Eurasian J Agric Environ Sci**4**(6): 687-692.

Khan, A. A., G. Jilani, et al. (2009). "Phosphorus solubilizing bacteria: occurrence, mechanisms and their role in crop production." J agric biol sci**1**(1): 48-58.

Kim, K., D. Jordan, et al. (1997). "Effect of phosphate-solubilizing bacteria and vesicular-arbuscular mycorrhizae on tomato growth and soil microbial activity." Biology and fertility of soils**26**(2): 79-87.

Kirdi, B. (2011). Rôle des PGPR «Plant Growth Promoting Rhizobacteria» dans la croissance végétale et la lutte contre les phanérogames parasites.

Kleche, M. (2013). Utilisation des systèmes biologiques dans l'épuration des eaux usées cas de la région d'Annaba, Université de Annaba-Badji Mokhtar.

Kloepper, J., A. Gutierrez-Estrada, et al. (2007). "Photoperiod regulates elicitation of growth promotion but not induced resistance by plant growth-promoting rhizobacteria." Canadian journal of microbiology**53**(2): 159-167.

Kloepper, J. W. (1992). "Plant growth-promoting rhizobacteria as biological control agents." Soil microbial ecology.

Kopečný, J., B. Hodrová, et al. (1996). "The isolation and characterization of a rumen chitinolytic bacterium." Letters in applied microbiology**23**(3): 195-198.

Kumar, P., R. Dubey, et al. (2012). "Bacillus strains isolated from rhizosphere showed plant growth promoting and antagonistic activity against phytopathogens." Microbiological research**167**(8): 493-499.

Labuschagne, N., T. Pretorius, et al. (2010). Plant growth promoting rhizobacteria as biocontrol agents against soil-borne plant diseases. Plant growth and health promoting bacteria, Springer: 211-230.

LARADJ ZAZOU, K. (2017). Isolement et caractérisation des rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes capables de lutter contre le Fusarium.

Lavoie, C. (2008). "Le roseau commun (*Phragmites australis*): une menace pour les milieux humides du Québec."

Lopez, S. (2018). Déterminisme de la diversité bactérienne rhizosphérique des hyperaccumulateurs de nickel.

Louden, B. C., D. Haarmann, et al. (2011). "Use of blue agar CAS assay for siderophore detection." Journal of microbiology & biology education: JMBE**12**(1): 51.

Madigan, M. T., J. M. Martinko, et al. (1997). Brock biology of microorganisms, Prentice hall Upper Saddle River, NJ.

Mal, T. K. and L. Narine (2004). "The biology of Canadian weeds. 129. *Phragmites australis* (Cav.) Trin. ex Steud." Canadian Journal of Plant Science**84**(1): 365-396.

Mansour, F., H. Aldesuquy, et al. (1994). "Studies on plant growth regulators and enzymes production by some bacteria."

Maroua, A. and H. Hanen (2017). Etude des PGPR "Plant Growth Promoting Rhizobacteria" des plantes actinorhiziennes : cas de *Casuarina equisetifolia* et d'*Elaeagnus angustifolia*. Biologie et Ecologie Végétale, Frères Mentouri Constantine: 105.

Marschner, P., C.-H. Yang, et al. (2001). "Soil and plant specific effects on bacterial community composition in the rhizosphere." Soil biology and biochemistry**33**(11): 1437-1445.

Martínez-Viveros, O., M. Jorquera, et al. (2010). "Mechanisms and practical considerations involved in plant growth promotion by rhizobacteria." Journal of soil science and plant nutrition**10**(3): 293-319.

Mayr, E. (1969). "Principles of systematic zoology." Principles of systematic zoology.

Miethling, R., G. Wieland, et al. (2000). "Variation of microbial rhizosphere communities in response to crop species, soil origin, and inoculation with *Sinorhizobium meliloti* L33." Microbial ecology**40**(1): 43-56.

Miransari, M. (2011). "Soil microbes and plant fertilization." Applied microbiology and biotechnology**92**(5): 875-885.

Nabors, M. (2008). Biologie végétale, Pearson Education, France.

Nabti, E. (2007). "Restauration de la croissance d'*Azospirillum brasilense* et de *Bl dur* et leur osmoprotection par *Ulva lactuca* en Milieux Sals." Thse de Doctorat en Science Biologique. Universit Abderrahmane Mira de Bejjai. 147p.

Nabti, E., L. Adjaoute, et al. (2018). "Isolement de bactéries telluriques «PGPR» productrices de substances antifongiques et stimulatrices de la croissance des plantes."

Naik, P. R. and N. Sakthivel (2006). "Functional characterization of a novel hydrocarbonoclastic *Pseudomonas* sp. strain PUP6 with plant-growth-promoting traits and antifungal potential." Research in Microbiology**157**(6): 538-546.

Nalini, M. and H. Prakash (2017). "Diversity and bioprospecting of actinomycete endophytes from the medicinal plants." Letters in applied microbiology**64**(4): 261-270.

Nannipieri, P., L. Giagnoni, et al. (2011). Role of phosphatase enzymes in soil. Phosphorus in action, Springer: 215-243.

NAS, F. (2013). Étude de molécules antibiotiques biosynthétisées par une bactérie extrêmophile B1 isolée d'une sebkha d'EL Goléa (Algérie), Université de Tlemcen.

Nautiyal, C. S. (1999). "An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms." FEMS microbiology Letters**170**(1): 265-270.

Ndiaye, S. O., A. Diouf, et al. (2020). "Isolement et caractérisation physiologique de rhizobactéries d'oignon cultivé dans la zone vallée Fleuve Sénégal." Afrique SCIENCE**16**(1): 300-306.

Nemouchi, S., S. E. Fella, et al. (2017). "Étude de la rhizosphère de trois plantes dans quelques régions d'Algérie."

Norini, M.-P. (2007). Écodynamique des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) et des communautés microbiennes dans des sols à pollution mixte (HAP, métaux) avant et après traitement par biopile et par désorption thermique: influence de la rhizosphère et de la mycorhization.

Nouadri, T. (2011). "L' α -amylase de *Penicillium camemberti* PL21: Production, Purification, Caractérisation et Immobilisation." Diplôme de Doctorat. Université Mentouri, Constantine. 143p.

Novinscak, A. and M. Fillion (2018). "Enhancing total lipid and stearidonic acid yields in *Buglossoides arvensis* through PGPR inoculation." Journal of applied microbiology**125**(1): 203-215.

Ongena, M., A. Giger, et al. (2002). "Study of bacterial determinants involved in the induction of systemic resistance in bean by *Pseudomonas putida* BTP1." European Journal of Plant Pathology**108**(3): 187-196.

Orhan, E., A. Esitken, et al. (2006). "Effects of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on yield, growth and nutrient contents in organically growing raspberry." Scientia Horticulturae**111**(1): 38-43.

Osman, J. R., G. Fernandes, et al. (2017). "Bacterial diversity of the rhizosphere and nearby surface soil of rice (*Oryza sativa*) growing in the Camargue (France)." Rhizosphere**3**: 112-122.

Otieno, N., R. D. Lally, et al. (2015). "Plant growth promotion induced by phosphate solubilizing endophytic *Pseudomonas* isolates." Frontiers in microbiology**6**: 745.

Park, M., C. Kim, et al. (2005). "Isolation and characterization of diazotrophic growth promoting bacteria from rhizosphere of agricultural crops of Korea." Microbiological research**160**(2): 127-133.

Patel, A. K., V. K. Singh, et al. (2010). "Purification and characterization of a new chitinase from latex of *Ipomoea carnea*." Process Biochemistry**45**(5): 675-681.

Penrose, D. M. and B. R. Glick (2003). "Methods for isolating and characterizing ACC deaminase-containing plant growth-promoting rhizobacteria." Physiologia Plantarum**118**(1): 10-15.

Pérez-Montaña, F., C. Alías-Villegas, et al. (2014). "Plant growth promotion in cereal and leguminous agricultural important plants: from microorganism capacities to crop production." Microbiological research**169**(5-6): 325-336.

- Petit, J. and P. Jobin (2005). La fertilisation organique des cultures: les bases, Fédération d'agriculture biologique du Québec.
- Philippot, L., J. M. Raaijmakers, et al. (2013). "Going back to the roots: the microbial ecology of the rhizosphere." Nature Reviews Microbiology**11**(11): 789-799.
- Pidwirny, M. (2006). "Biogeochemical cycling: inputs and outputs of nutrients to ecosystems." Fundamentals of Physical Geography. <http://www.physicalgeography.net/fundamentals/9p.html>.
- Pieterse, C., S. Van Wees, et al. (2002). "Signalling in rhizobacteria-induced systemic resistance in *Arabidopsis thaliana*." Plant biology**4**(5): 535-544.
- Pikovskaya, R. (1948). "Mobilization of phosphorus in soil in connection with vital activity of some microbial species." Mikrobiologiya**17**: 362-370.
- Podile, A. R. and G. K. Kishore (2007). Plant growth-promoting rhizobacteria. Plant-associated bacteria, Springer: 195-230.
- Praptiwi, M. R., D. Wulansari, et al. (2018). "Antibacterial and antioxidant activities of endophytic fungi extracts of medicinal plants from Central Sulawesi." Journal of Applied Pharmaceutical Science**8**(08): 069-074.
- Qureshi, M., Z. Ahmad, et al. (2012). "Role of phosphate solubilizing bacteria (PSB) in enhancing P availability and promoting cotton growth." J. Anim. Plant Sci**22**(1): 204-210.
- Rameau, J.-C., D. Mansion, et al. (2008). Flore forestière française: guide écologique illustré. Région méditerranéenne, Forêt privée française.
- Ramette, A., M. Frapolli, et al. (2003). "Phylogeny of HCN synthase-encoding hcnBC genes in biocontrol fluorescent pseudomonads and its relationship with host plant species and HCN synthesis ability." Molecular Plant-Microbe Interactions**16**(6): 525-535.
- Rathaur, P., W. Raja, et al. (2012). "Effect of UV-B tolerant plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on seed germination and growth of *Withania somnifera*." Adv. Appl. Sci. Res**3**: 399-1404.
- Réale, D., S. M. Reader, et al. (2007). "Integrating animal temperament within ecology and evolution." Biological reviews**82**(2): 291-318.
- REFFAS, F.-Z. I. (2017). Isolement et caractérisation de bactéries productrices de cellulase.
- Şahin, F., R. Çakmakçı, et al. (2004). "Sugar beet and barley yields in relation to inoculation with N 2-fixing and phosphate solubilizing bacteria." Plant and soil**265**(1-2): 123-129.
- Saleem, M., M. Arshad, et al. (2007). "Perspective of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) containing ACC deaminase in stress agriculture." Journal of industrial microbiology & biotechnology**34**(10): 635-648.

- Shameer, S. and T. Prasad (2018). "Plant growth promoting rhizobacteria for sustainable agricultural practices with special reference to biotic and abiotic stresses." Plant Growth Regulation**84**(3): 603-615.
- Silia, A. and G. Narimane (2014). Recherche des caractères d'intérêt agricole chez certaines bactéries rhizosphériques. microbiologie, Abderrahmane Mira de Bejaia: 81.
- Smibert, R. (1994). "Phenotypic characterization." Methods for general and molecular bacteriology.
- Somers, E., J. Vanderleyden, et al. (2004). "Rhizosphere bacterial signalling: a love parade beneath our feet." Critical reviews in microbiology**30**(4): 205-240.
- Tejera, N., E. Ortega, et al. (2003). "Effect of some abiotic factors on the biological activity of *Gluconacetobacter diazotrophicus*." Journal of applied microbiology**95**(3): 528-535.
- Toal, M., C. Yeomans, et al. (2000). "A review of rhizosphere carbon flow modelling." Plant and soil**222**(1-2): 263-281.
- Vacheron, J., G. Desbrosses, et al. (2013). "Plant growth-promoting rhizobacteria and root system functioning." Frontiers in plant science**4**: 356.
- Van Loon, L. (2007). Plant responses to plant growth-promoting rhizobacteria. New perspectives and approaches in plant growth-promoting Rhizobacteria research, Springer: 243-254.
- Vessey, J. K. (2003). "Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers." Plant and soil**255**(2): 571-586.
- Voisard, C., C. Keel, et al. (1989). "Cyanide production by *Pseudomonas fluorescens* helps suppress black root rot of tobacco under gnotobiotic conditions." The EMBO Journal**8**(2): 351-358.
- Walker, T. S., H. P. Bais, et al. (2003). "Root exudation and rhizosphere biology." Plant physiology**132**(1): 44-51.
- Walters, C., L. M. Wheeler, et al. (2005). "Longevity of seeds stored in a genebank: species characteristics." Seed Science Research**15**(1): 1-20.
- Weyens, N., S. Monchy, et al. (2010). Plant-Microbe Partnerships. Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology.
- Wilson, P. W. and S. G. Knight (1952). "Experiments in bacterial physiology."
- Zahra, B. and M. Iman (2016). "Évaluation et taxonomie numérique des bactéries promotrices des plantes isolées de rhizosphère du *Capsicum annum*."

Annexes

Annexe 1 :

Equipment

Autoclave (HIRAYAMA)
Agéateur–plaque chauffante
Balance (OHAUS)
Barreaux magnétiques
Bec bunsen
Centrifuge (SiGma1-16)
Conductimètre (JENWAY)
Etuve (RAYPA)
Four à moufle (protherm Furnaces)
pH mètre (Adwa)
Microscope optique (SMART)
Réfrigérateur (IRIS SAT)
Spectrophotomètre (SpectroScan40)
Vortex

Verrerie

Becher de 1000ml ,500ml et 250ml
Boite pétrie en plastique
Erlenmeyersde 500ml et de 250ml
Flacon en verre de 250ml
Micropipette de 1000 µL avec embouts
Pipette Pasteur
Pipette graduées
Anse de platine
Tube à essais
Lame et lamelle
Spatule
Verre de montre

Annexe 2 : Composition des milieux de culture

Milieu de gélose nutritive	
Peptone	5 g
NaCl	5 g
Extrait de levure	2 g
Extrait de viande	1 g
Agar	15g
Eau distillée	1000 ml
pH 7	
TSA (Gélose Trypticase de soja)	
Peptone de Caséine	15g
Peptone de soja	5g
Chlore de sodium	5g
Agar	15g
Eau distillée	1000 ml
pH	7,4
Bouillon Luria Bertani LB (g/l)	
Tryptone	10g
Extrait de levure	5g
Chlorure de sodium	10g
Eau distillée	1000 ml
pH du milieu	7,0 ± 0,2
Milieu PVK (Pikovskaya 1948)	
Glucose	10g
Ca ₃ (PO ₄) ₂	5g
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.5g
NaCl	0.2g
MgSO ₄ -7H ₂ O	0.1g
KCl	0.2g
Extrait de levure	0.5g
MnSO ₄ -H ₂ O	0.002g
FeSO ₄ -7H ₂ O	0.002g
Agar	15g
Eau distillée	1000ml
pH	7
B bouillon + tryptophane	
Peptone	10 g
Extrait de levures	5 g
NaCl	0,5 g
Tryptophane	0,5 g
Eau distillée	1000ml
PH	7,2

Milieu minimum M9 glucose avec thiamine

Na ₂ HPO ₄ , 6H ₂ O	14,3 g
KH ₂ PO ₄	3 g
NaCl	0.5 g
NH ₄ Cl	1 g
Agarose	15 g
H ₂ O	1000ml
Ajuster le pH à 7.4, passer à l'autoclave (15 minutes à 110°C), laisser refroidir, et ajouter :	
MgSO ₄ 1M	2 ml
Glucose 20%	10 ml
CaCl ₂ 1 M	0.1 ml
Thiamine	0.01%

Milieu d'Alexandrov

Glucose	5 g
MgSO ₄ -7H ₂ O	0,5 g
CaCO ₃	1 g
FeCl ₃	0,006 g
Ca ₃ PO ₄	2 g
KAlSi ₃ O ₈	3g
Agar	20 g
Eau distillée	1000 ml
pH :7	

Milieu N-free

K ₂ HPO ₄	1.0g
MgSO ₄	0.2g
CaCO ₃	1.0g
NaCl	0.2g
Glucose	10g
Agar	18g
Eau distillée qsp	1000 ml
pH 7.2	

Milieu Chrome Azurol S (CAS)

2,7 mg de FeCl₃.6H₂O dissous dans 10 ml de HCl 10 mM avec 1,21g/l de CAS dissous auparavant dans 50 ml d'eau distillée. Ce mélange, de couleur bleu foncée, est ajouté très lentement sous agitation

à 1,821g de Hexa méthylammonium bromure (HDTMA) dissous dans 40 ml d'eau distillée, le pH est ajusté à 7. La solution bleu foncé obtenue est autoclavée à 121 °C /15 min.

A 900 ml de King B, 100ml de la solution CAS- HDTMA est ajouté dans une Erlenmeyer stérile (le mélange doit être homogénéisé). Couler ce milieu dans les boîtes de Pétri.

Annexe 3 : Solutions

Eau physiologique	
Eau distillée stérile	1000ml
NaCl	9g
Réactif de Nessler	
Iodure de potassium	50g
Dichlorure de mercure	solution saturée
Solution d'hydroxyde de Na 9N	400ml
Réactif de Salkowski	
FeCl ₃	(0,5 M) 1 ml
Acide perchlorique	50 ml, (35%)

Annexe 4 : Coloration de Gram

◇ Réalisation du frottis

- Nettoyer une lame de verre à l'éthanol/acétone.
- Déposer sur une lame propre une goutte de suspension bactérienne.
- Réaliser le frottis à partir du centre de la lame en décrivant un mouvement circulaire.
- Sécher le frottis en passant la lame à la flamme du bec Bunsen (2 à 3 fois).

◇ Réalisation de la coloration de Gram

- Verser quelques gouttes de violet de gentiane sur le frottis laisser 1 minute puis éliminer l'excès de violet de gentiane avec un peu d'eau sans insister.
- Plonger la lame 30s dans le lugole puis rincer abondamment à l'eau.
- Rincer avec l'éthanol/acétone pendant 10s puis rincer abondamment à l'eau.
- Plonger la lame 1 minute dans la fushsine, rincer abondamment à l'eau.

◇ Observation microscopique

Observation au microscope optique au grossissement x100 après l'ajout d'une goutte d'huile à immersion.

◇ Lecture des résultats

Les bactéries à Gram positif apparaissent violettes et les bactéries à Gram négatif apparaissent roses.