

République Algérienne Démocratique et Populaire

**Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche
Scientifique**



Université Ahmed DRAIA



- Adrar-

Mémoire Master Académique

En vue de l'obtention du diplôme du Master académique.

Faculté : Sciences et de la Technologie

Département : Science de la Nature et de la Vie

Spécialité : Systèmes de Production Agro-écologiques

Intitulé

**Isolement des Pseudomonas des Oasis d'Adrar Leur
Caractérisation en tant que Rhizobacteries Favorisants la
Croissance des Plantes PGPR**

Présentée par : Mr. AZZAOUI Abdelhmid
Mr. BEN ABDELKARIM
Elmabrouk

Devant le jury compose de :

Président	M. ABEKHTI Abdelkader	M C A	Unive . d'Adrar
Promoteur	M. IDDER Boubaker	M A A	Unive. d'Adrar
Examineurs	M. OUAINI Abderrahman	M A A	Unive. d'Adrar

Année universitaire : 2020/2021

I. Remerciements

Nous tenons à remercier le Dieu le tout puissant de nous avoir donné la volonté et de Courage pour réaliser ce modeste travail. Au terme de ce travail, nous tiens tout d'abord à remerciement et ma gratitude s'adressent à ma promotrice Mr IDDER Boubakeurr, sa patience et sa disponibilité. C'est avec beaucoup de reconnaissance que j'adresse mes sincères remerciements à Mr. ABEKHTI Abdelkader d'avoir accepté de présider le jury de ce mémoire. Mes sincères remerciements vont également à Madame BOUFELDJA W, de m'avoir fait l'honneur d'examiner ce travail.

II. Dédicaces

Je dédie cet humble travail à mes honorables parents et à ceux qui ont déménagé à côté de son Seigneur cette année, mon vieil homme et mon fils, ECheikh ELHaj Abdelkader Sidi Amar, et à toute la famille honorable, jeunes et vieux, et à tous les amis

Elmabrouk

Dédicaces

Je dédie cet humble travail à mes honorables parents, à toute la famille honorable, jeune et vieux, et à tous mes amis.

Abdelhamide

III. Liste des figures

Figure 1 test de CCM.....	23
Figure 2 Trois concentrations de cuivre.....	25
Figure 3 examen microscopique.....	27
Figure 4 Résultats de quelques tests oxydase.....	28
Figure 5 Production de fluorescence.....	29
Figure 6 Production et quantification de pyoverdine les 5 souche.....	29
Figure 7 Production de pyocyanine le souch OA47.....	29
Figure 8 : Spectre d'absorption de l'extrait de la pyoverdine.....	خطأ! الإشارة المرجعية غير معروفة.
Figure 9 Spectres d'analyse UV-Visibles des pyoverdines.....	30
Figure 10 Par chromatographie sur couche mince CCM.....	31
Figure 11 Par photomètre infra-rouge FT-IR.....	32
Figure 12 Par résonance magnétique nucléaire RMN.....	32
Figure 13 absorbances des milieux de culture de test de résistance à la salinité.....	33
Figure 14 absorbances des milieux de culture de test de résistance à la cuivre.....	34
Figure 15 : Les zones d'inhibitions de l'activité antagoniste.....	35
Figure 16 Graphiques à barres pour les échantillons les plus répulsifs.....	35
Figure 17 Test d'échantillon d'agent pathogène avec extrait pyoverdine des souch OB14.OA44.OA45.OA47.....	36
Figure 18 Graphiques à barres pour les échantillons les plus répulsifs pour extraits pyoverdine.....	36
Figure 19 test de solubilisation de phosphate sur deux isolats OA47 et OB14.....	خطأ! الإشارة المرجعية غير معروفة.
Figure 20 Graphiques Diamètre moyen par échantillon.....	37
Figure 21 test de HCN pour 5 souche.....	38
Figure 22 Effet de salinité et de cuivre sur la production de IAA dans des milieux liquides.....	39

IV. Liste des tableau

Tableau 1 Résultats de quelques tests oxydase.....	28
Tableau 2 Résultats de quelques tests catalase.....	29
Tableau 3 valeur de test CCM.....	31
Tableau 4 Analyse de la pyoverdine par FTIR.....	31
Tableau 5 absorbances des milieux de culture de test de résistance à la salinité des bactéries.....	33
Tableau 6 absorbances des milieux de culture de test de résistance à la cuivre.....	34
Tableau 7 La distance entre l'échantillon d'agent pathogène et seuch	35
Tableau 8 Valeurs de répulsion avec l'échantillon pathogène et extraits pyoverdine	36
Tableau 9 Diamètre moyen par échantillon	37
Tableau 10 : Effet de salinité et de cuivre sur la production de IAA dans des milieux	38

V. LISTE des ABRÉVIATIONS

AIA : Acide Indole Acétique

HCN: Hydro cyanidric acid

ISR : Résistance systémique induite

NaCl : Chlorure de Sodium

nm: nanomètre

PGPR: Plant Growth Promoting Rhizobacteria

PH : Potentiel Hydrogène

RFLP : Restriction Fragment Length Polymorphism

P : *Pseudomonas*

HCN : Acide cyanhydrique

Fig. : Figure

KB : milieu King B

GN : gélose nutritive

H₂O₂ : l'eau oxygénée

Sommaire

Remerciements	3
Dédicaces	4
Dédicaces	5
Abstract	48
1. Introduction	1صح
2 Genre <i>Pseudomonas</i>	4
3 Taxonomie des <i>Pseudomonas</i> :.....	4
3.1 Taxonomie.....	4
4 Caractéristique.....	5
4.1 Caractéristiquesdes groupes phylogénétiques des <i>Pseudomonas</i>	5
4.2 Caractéristiques morphologiques :	6
4.3 Caractéristiques biochimiques et physiologiques.....	6
5 Notion de PGPR.....	8
6 Les grandes fonction des PGPRs	8
7 Biofertilization	8
7.1 Production de phytohormone.....	9
7.2 Productionanti biotique (Bio control)	10
7.2.1 Productions des antibiotiques :	10
7.2.2 Biocontrole	11
7.3 Solubilisationde minéraux et biodisponibilité des métaux dons e sol.....	12
7.3.1 Fixation biologique de l'azote	12
7.3.2 Solubilisation du Phosphate	13
8 Bio régulation	14
8.1 Synthèse (hormone, enzyme)	14
8.2 Enzyme (Accdeaminase).....	15
8.3 Promotiondes plantessous stressebiotique/ abiotique	15
Le rôle des bactéries dans la tolérance des plantes aux stress	15
Tolérance aux stress abiotiques induite par des bactéries bénéfiques.....	16
9 production de HCN.....	16
Matériels et méthodes	19
10 Isolement des bactéries du sol :.....	19

11	L'observation macroscopique :	19
12	La purification.....	19
13	La Coloration de Gram :	19
14	Test de recherche d'oxydase:.....	20
15	Texte de la catalase :	20
16	Production de fluorescence :	21
17	Production de pyoverdine :	21
18	Production de pyocyanine :	21
19	Production et extraction de phénazine :	21
20	Production et extraction de pyocyanine :	22
21	Production et extraction de la pyoverdine	22
22	Caractérisation de la pyoverdine	22
22.1	Analyse de l'extrait de pyoverdine par UV-Visible.....	22
22.2	Identification par chromatographie en couche mince (CCM).....	22
22.3	Analyse de la pyoverdinepar FTIR.....	23
23	Texte de résistance à la salinité	23
24	Tolérance au cuivre	23
25	antagonistes	24
26	Test d'antibiogramme	24
27	Test de solubilisation de phosphate	24
28	Production d'acide cyanhydrique (HCN)	25
29	Production de IAA.	25
	Résultats et discussion	27
30	Isolement des souches de groupe Pseudomonas	27
31	L'observation microscopique :	27
32	Coloration de Gram.....	27
33	Test de recherche oxydase et catalase.	28
34	Texte oxydase.....	28
35	Test de catalase.....	28
36	Production de fluorescence :	28
	29
37	Production et quantification de pyoverdine :	29
38	Production de pyocyanine :	29
39	Caractérisation de la pyoverdine	30
39.1	Analyse de l'extrait de pyoverdine par UV-Visible	30

39.2	Identification par chromatographie en couche mince (CCM).....	30
39.3	Analyse de la pyoverdine par FTIR.....	31
39.4	Par résonance magnétique nucléaire RMN.	32
	32
40	Test de résistance à la salinité.....	33
41	Tolérance au cuivre	34
42	Test d'antagonisme	34
43	Test d'antibiogramme	36
	36
44	Test de solubilisation de phosphate	37
45	Acide Cyanhydrique (HCN).....	38
46	Production de IAA.	38
	Conclusion	41
	Les références bibliographiques	43
	Annexes	46

Introduction

Générale

1. Introduction

Parmi les bactéries qui colonisent la rhizosphère, les PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria) possèdent plusieurs facteurs caractéristiques intrinsèques qui les rendent particulièrement intéressantes en vue de leur utilisation comme agents de lutte biologique, néanmoins les bactéries sont les représentants les plus importants quantitativement.

L'ampleur de cette compétition s'intensifie au voisinage des racines ou zone rhizosphérique de par l'apport de substrats carbonés par la plante. Les microorganismes rhizosphériques, en général, exercent en tant qu'agent de lutte biologique.

Ces souches bactériennes présentant pour la plupart des propriétés antagonistes vis-à-vis des champignons pathogènes ont très vite acquis un statut de vedette comme agent de lutte biologique et constituent une alternative prometteuse aux engrais chimiques et aux pesticides.

Les mesures de contrôles alternatif telle que l'utilisation d'antagonistes sont nécessaires et ont besoin d'être explorés. Cette stratégie est basée sur l'utilisation de microorganismes qui ont soit un potentiel inhibiteur de l'agent causal, soit l'habilité d'accroître le mécanisme de défense de la plante (Piga et *al.*, 1997 ; Lakrin et Fravel, 1998 ; Benhamou et Nicole, 1999 ; De Boer et *al.*, 1991 ; Chérif et *al.*, 2002 ; Silva et *al.*, 2004).

Parmi les antagonistes qui règnent dans les sols saturés en microflore équilibrée pour le milieu et le biotope, on rencontre presque toujours des espèces du genre *Pseudomonas* et *Bacillus*, ces microorganismes ont une grande capacité à produire des substances antimicrobiennes et à entrer en compétition spatiale et nutritionnelle avec les agents phytopathogènes. Le contrôle des phytopathogènes de manière biologique est plus avantageux pour l'environnement en comparaison avec le contrôle chimique (Nautiyal, 2001).

C'est dans cette optique que s'inscrit notre travail dont l'objectif principal consiste à :

La revivification et la ré identification d'une collection de souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents et *Bacillus* sp. isolées préalablement à partir du sol rhizosphérique de trois plantes cultivées à savoir les nêfles, la pomme de terre et l'orge.

La recherche de quelques enzymes a effet hydrolytique tels que : les lipases, les amylases, les cellulases, les caséinases et les chitinases.

L'étude du pouvoir de production de l'acide indole acétique et de l'acide cyanhydrique à effet PGPR.

L'effet antagoniste des différentes souches étudiées des deux genres *Pseudomonas* spp. fluorescents ainsi que *Bacillus* sp. contre *Verticillium dahliae* agent de la verticilliose

Chapiter I

Generalités sur les *Pseudomonas*

1 Genre *Pseudomonas*

Les *Pseudomonas* appartiennent au phylum des Proteobacteria, classe des Gamma proteobacteria, ordre des Pseudomonales. Ce sont des bacilles à Gram négatif, droits et fins, aux extrémités arrondies, d'une taille moyenne de 2 à 0,5 µm (Palleroni, 1984). Ces bactéries sont mobiles, elles sont capables d'utiliser de nombreux substrats hydrocarbonés comme sources de carbone et d'énergie. Les *Pseudomonas* ont une capacité élevée à coloniser la rhizosphère ainsi que les racines des plantes, elles sont capables de former des associations intimes avec leurs hôtes (Höfte et de Vos, 2006), ce qui réduit le nombre de sites habitables pour les microorganismes pathogènes et par conséquent, leur croissance (Reyes et al., 2004)

2 Taxonomie des *Pseudomonas*:

Au cours de ces dernières années, le nombre des PGPR identifiées a augmenté d'une façon significative, parce que le rôle de la rhizosphère comme écosystèmes a gagné de l'importance dans le fonctionnement de la biosphère et que les mécanismes d'action des PGPR ont été suffisamment étudiés. Ces microorganismes cultivables, présentant une diversité de genres et d'espèce, appartiennent majoritairement aux trois phylums suivants :

Proteobactéries, Firmucutes et Actinobactérie et Bacteroidetes (Hugenholtz, 2002)

2.1 Taxonomie.

-classification botanique :

La classification des *Pseudomonas* est la suivante :

Règne : Bacteria

Division : proteobacteria

Classe : Gammaproteobacteria

Ordre : Pseudomonadales

Famille : Pseudomonadaceae

Genre : *Pseudomonas*

3 Caractéristique.

3.1 Caractéristiques des groupes phylogénétiques des *Pseudomonas*

Dans la phylogénie des *Pseudomonas*, deux lignées sont clairement distinctes. La première lignée de *P. fluorescens*, divisé en six groupes, *P. fluorescens* (56 espèces), *P. syringae* (12 espèces), *P. lutea* (3 espèces), *P. putida* (12 espèces), *P. anguilliseptica* (8 espèces), et *P. straminea* (4 espèces). Le groupe de *P. fluorescens* était le plus complexe et comprenait neuf sous-groupes (SG) qui étaient représentés par les espèces *P. fluorescens*, *P. gessardi*, *P. fragi*, *P. mandelii*, *P. jesseni*, *P. koreensis*, *P. corrugata*, *P. chlororaphis* et *P. asplenii*.

Ces bactéries peuvent se multiplier dans un intervalle de température qui varie de 4 à 42 °C, la limite supérieure de ce dernier est spécifique à l'espèce *P. aeruginosa*, tandis que les saprophytes ont un optimum de croissance situé entre 28 et 30 °C.

La plupart des *Pseudomonas* (*P. aeruginosa* et les espèces saprophytes) possédant une chaîne cytochromique complète comprenant une cytochrome C

oxydase, contrairement aux espèces phytopathogènes dépourvues de cette enzyme (Lelliot et al., 1966; Stanier et al., 1966;).

La deuxième lignée de *P. aeruginosa*, est divisée en quatre groupes principaux, représentée par les espèces *P. aeruginosa* (15 espèces), *P. oleovorans* (6 espèces), *P. stutzeri* (4 espèces) et *P. oryzihabitans* (2 espèces).

La plupart des espèces sont incluses dans des groupes phylogénétiques qui coïncident avec les groupes phénotypiques classiques de *P. fluorescens*, *P. syringae*, *P. putida*, *P. stutzeri* et *P. aeruginosa*, et les caractéristiques de chacun d'entre eux peuvent être étendues probablement à l'ensemble du groupe.

L'utilisation d'arginine comme source de carbone est limitée à quelques espèces des *Pseudomonas* telles que : *P. putida*, *P. fluorescens*, *P. aeruginosa*, *P. mendocina*, *P. stutzeri*, *P. pseudoalcaligenes*, *P. syringae*, *P. cepacia*, *P. testosteroni*, *P. acidovorans*, and *P. maltophilia* (Palleroni et al., 1974).

Les microorganismes utilisent l'arginine par différentes voies telles que (1) arginine déiminase (ADI), (2) la voie de l'arginine décarboxylase (ADC), (3) l'arginine déshydrogénase

(ADH), et (4) la voie de l'arginine succinyl-transférase (AST) (L'arginine est métabolisé via la voie AST en aérobiose et par la voie ADI en anaérobiose (Haas et al., 1990).

3.2 Caractéristiques morphologiques :

Les bactéries de genre *Pseudomonas* sont des bacilles a Gram négatif, des bâtonnets droits ou faiblement incurvés de 0,5 a 1 µm de diamètre sur 1,5 a 5 µm de long (prescott et al.2003) non sporulés, généralement mobiles grâce a une ciliature polaire multitriche, rarement immobiles. La taille du génome du groupe *Pseudomonas* fluorescents varie d'environ 6,4 Mb a 7,7 Mb (Paulsen et al.,2005, Silby et al., 2009) pas de différence significative dans la structure du peptidoglycane de la paroi Les cellules de *Pseudomonas* fluorescents cultivées en condition de stress nutritif s'allongent de manière a à former de longs bacilles de faible

3.3 Caractéristiques biochimiques et physiologiques

Le test de catalase et oxydase est le plus souvent positive, elles sont incapables de fermenter le glucose. Mésophiles, chimio-organotrophes puisqu'elles peuvent croitre dans un milieu minérale ne contenant qu'une seule source de carbone. La temperature optimale pour la croissance des espèces saprophytes est située entre 28°C et 30°C. Toutes les espèces de ce genre ne peuvent croitre à pH inferieur a 4.5 (Palleroni, 1984).Certaines populations de *Pseudomonas* spp. fluorescents ont la possibilité de dissimiler l'azote Cette dissimilation est plus ou moins complète selon le groupe taxonomique considéré (Matsubara et Zumft, 1982).

Ces bactéries ont une longévité faible en culture même a 4°C, tous les modes de conservation possibles sont proposés : Lyophilisation, eau distillé stérile avec une anse de culture a température ordinaire de 18°C (*Pseudomonas* phytopathogènes), gélose inclinée avec huile de paraffine, surface d'une gélose molle, tube a vis comme pour les Entérobactéries, congélation

Chapter II

***Pseudomonas* et PGPRs**

4 Notion de PGPR.

Diverses souches de PGPR ont été utilisées avec succès pour les inoculations des cultures. Celles-ci comprennent les membres bactériens du genre *Azospirillum* (Cassan et al., 2008), *Bacillus* (Jacobsen et al., 2004), *Pseudomonas* (Loper et al., 2007), *Rhizobium* (Long, 2001). Ces bactéries sont connues pour s'associer avec les racines de blé, les graminées tropicales, le maïs, et d'autres céréales (Okon et Hadar, 1987; Lindberg et Granhall, 1984). Les *Azospirillum* spp. ont été identifiés principalement comme bactéries de la *rhizosphère*, et leur mécanisme de coloniser la rhizosphère a été étudié par divers chercheurs (Steenhoudt et Vanderleyden, 2000). L'association entre les plantes et les bactéries bénéfiques montrent une réponse protectrice sous conditions restrictives de l'environnement. Le blé soumis au stress salin a montré une croissance plus forte lorsqu'il est inoculé avec *Azospirillum*, par rapport aux plantes non-inoculées. Cet effet favorable peut être appliqué directement ou indirectement, sur la physiologie des plantes. La production des métabolites microbiens comme les polysaccharides modifie la structure du sol et présente un effet positif sur les plantes cultivées en stress hydrique. L'inoculation peut favoriser l'allongement de la racine (Dobbelaere et al., 1999), le développement des racines latérales et adventives (Creus et al., 2005; Molina-Favero et al., 2008), les poils absorbants (Hadas et Okon, 1987) et la ramification des poils racinaires (Jain et Patriquin, 1985). Ces réponses de développement de la morphologie racinaire sont déclenchées par des phytohormones synthétisées par les rhizobactéries.

5 Les grandes fonction des PGPRs

Les PGPR participent à augmenter la disponibilité des nutriments et des phytohormones dans la rhizosphère, ceci stimule directement le développement et la croissance de la plante, les mécanismes les plus importants sont cités ci-dessous.

6 Biofertilization

Le biofertilisant est défini comme une substance qui contient des microorganismes vivants qui, lorsqu'ils sont appliqués aux semences, surfaces des plantes ou dans le sol, colonisent la rhizosphère ou à l'intérieur de la plante et favorise ainsi la croissance en augmentant la disponibilité des éléments nutritifs primaires à la plante hôte. Cette définition est

basée sur la logique que le terme biofertilisant est une contraction du terme fertilisant biologique « biological fertilizer » (Vessey, 2003).

Par ailleurs, le biofertilisant devrait contenir des organismes vivants qui augmentent latenteur en éléments nutritifs de la plante hôte à travers leur existence permanente en association avec la plante (Vessey, 2003). De plus, le terme biofertilisant ne doit pas être utilisé de manière

interchangeable avec les termes suivants : les engrais verts, fumier, cultures intercalaires ou organique complétée d'engrais chimiques (Vessey, 2003).

Cependant, une partie des PGPR ne sont pas considérés comme biofertilisants. Ainsi, les bactéries qui favorisent la croissance des plantes par le contrôle de l'organisme nuisible sont les biopesticides, mais pas des biofertilisants. Il est intéressant de savoir que certains PGPR favorisent la croissance en agissant à la fois comme biofertilisants et biopesticides (Vessey, 2003).

6.1 Production de phytohormone

Il existe cinq catégories des hormones végétales: les auxines, les gibbérellines, les cytokinines, l'éthylène et l'acide abscissique (Zahir et al., 2003).

Les gibbérellines et les cytokinines sont impliquées dans la modification de la morphologie des plantes et dans la stimulation de développement de la partie aérienne (Van Loon, 2007).

L'acide abscissique est synthétisé en réponse aux stress hydrique et salin, pour induire la fermeture des stomates et réduire la perte d'eau par transpiration, et par conséquent l'adaptation au stress salin (Finkelstein et al., 2002).

L'acide indole-3-acétique est une auxine considérée comme la phytohormone la plus répandue, la plus produite par les PGPR. Il joue un rôle très important dans l'élongation des racines et dans la prolifération des poils absorbants (Spaepen et al., 2007), C'est un acide faible formé d'un noyau indole et d'une courte chaîne latérale carbonée portant le groupement carboxyle. Il fonctionne comme une molécule signal importante dans la régulation du développement des plantes (Ashrafuzzaman et al., 2009).

L'analyse du rôle de l'AIA montre que les bactéries utilisent cette phytohormone pour établir des interactions avec les plantes dans le cadre de leur stratégie de colonisation de ces dernières (Ryan et al., 2008).

Il est généralement produit par les PGPR en utilisant les exsudats racinaires libérés dans la rhizosphère sous forme de métabolites secondaires. Les PGPR sont connues exclusivement pour leur capacité de fixation d'azote mais elles sont également signalées aussi pour produire des quantités importantes d'AIA (Ahmad et al., 2008).

Les phytohormones ont un rôle majeur dans le développement de la croissance des plantes et dans les réponses au stress (Shaterian et al., 2005).

Elles peuvent améliorer les différents systèmes de défense cellulaire pour la protection de la plante contre les conditions défavorables externes (Bianco et Defez, 2009).

La salinité et la sécheresse inhibent la production des auxines et des gibbérellines dans les racines et les feuilles des plantes (PerezAlfocea et al., 2010), entraînant une réduction du pourcentage de germination ainsi que la croissance de plante (Shakirova et al., 2003).

Les bactéries qui colonisent les racines et qui produisent les auxines dans des conditions salines, peuvent fournir des auxines supplémentaires dans la rhizosphère, ce qui pourrait aider à maintenir la croissance des racines sous stress, et peuvent également contribuer à maintenir la croissance des feuilles (Albacete et al., 2008).

Les PGPR peuvent avoir des impacts multiples sur l'état de phytohormones, ce qui peut améliorer la croissance, le développement et les processus physiologiques des plantes sous stress salin (Dodd et al., 2010).

6.2 Production anti-biotique (Bio control)

6.2.1 Productions des antibiotiques :

La production d'antibiotiques est considérée comme l'un des mécanismes de biocontrôle les plus puissants et les plus étudiés chez les PGPR. (Shilev, 2013) exemple d'antibiotiques produits par PGPR : l'acide phénazine-1-carboxylique l'oomycineA, les rhamnolipides (Fernando et al., 2005)

l'acide phénazine-1-carboxylique a été secrété par *Pseudomonas fluorescens* 2-79 Souche, *Pseudomonas fluorescens* 2-79, synthétise l'acide phénazine-1-carboxylique (PCA), un

antibiotique pigmenté qui inhibe *G. graminis* var. *Tritici* et d'autres agents pathogènes racémiques in vitro à moins de (1 g / ml), Les mutants de 2-79 défectueux dans la production de PCA (Phz-) ne parviennent pas à inhiber *G. graminis* var. *Tritici* et sont considérablement réduits dans leur capacité à supprimer le take-all, tandis que les mutants génétiquement restaurés pour la production de PCA (Phz +) regroupent de manière coordonnée l'activité antifongique in vitro et sur le blé. Ces résultats suggèrent fortement que le contrôle de prise en charge par la souche 2-79 est dû en grande partie à la production de PCA dans la rhizosphère de blé. Les efforts visant à définir le rôle des antibiotiques dans le contrôle biologique ont toujours été entravés par le manque de preuves directes que les antibiotiques sont présents dans les sols naturels dans lesquels la suppression de la maladie peut se produire. Les contraintes physiques et biologiques à la production, l'activité et la détection des antibiotiques dans le sol ont été revues, dont la plus fondamentale est probablement l'insuffisance nutritionnelle. Les sols modifiés avec des nutriments organiques ou traités pour augmenter la disponibilité des nutriments supportent souvent la production d'antibiotiques (Linda et al., 1990)

6.2.2 Biocontrôle

Les plantes ont la capacité d'acquérir un état de résistance systémique induite (ISR) contre des agents pathogènes après inoculation de bactéries bénéfiques. En association avec les racines des plantes, les bactéries bénéfiques peuvent amorcer le système immunitaire inné et conférer une résistance à un large spectre d'agents pathogènes, avec un impact minimal sur le rendement et la croissance (Van Hulten et al., 2006).

Par conséquent, l'amorçage de la résistance systémique induite offre une stratégie intéressante pour permettre aux plantes d'accroître leur résistance aux agressions des pathogènes. Plusieurs bactéries qui colonisent les racines des plantes peuvent aussi protéger les plantes contre les maladies foliaires. Ces familles de bactéries comprennent *Pseudomonas fluorescence*, *Pseudomonas putida*, *Bacillus pumilus* et *Serratia marcescens*.

Certaines rhizobactéries peuvent ainsi déclencher la résistance systémique induite. On trouve parmi celles-ci le *Paenibacillus salvei* (Tjamos et al., 2005), *Acinetobacter lwoffii* (Trotel-Aziz et al., 2008), *Chryseobacterium balustinum*, *Azospirillum brasilense* (Ramos Solano et al., 2008), *Curtobacterium* sp. *oxidans*, *Arthrobacter* (Barriuso et al., 2008), *Stenotrophomonas N6.8* (Domenech et al., 2007), et des *Actinobacteria* endophytiques (Conn et al., 2008).

Toutes ces bactéries se sont montrées capables de déclencher la résistance systémique induite lors d'essais dans les serres ou dans les champs sur une grande variété d'espèces végétales, y compris le riz, la luzerne, la tomate, et même des arbres (Van Loon, 2007).

6.3 Solubilisation de minéraux et biodisponibilité des métaux dans le sol

6.3.1 Fixation biologique de l'azote

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. L'azote est un aliment essentiel bien connu pour la croissance et le développement des plantes.

L'utilisation de bio-engrais tels que les bactéries fixatrices d'azote peut accroître la productivité et constitue une alternative viable qui contribue à réduire la pollution due aux applications d'engrais chimiques, à préserver l'environnement et à baisser le coût de la production. Ainsi, Figueiredo et al. (2008) ont rapporté que, au cours des deux dernières décennies, 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 (Sahin et al., 2004; Orhan et al., 2006).

Les microorganismes à associations symbiotiques produisent 80% de l'azote et le reste provient des systèmes libres ou associés (Graham, 1988). La fixation de l'azote non symbiotique a une grande importance agronomique (Saxena et Tilak, 1998). Les bactéries fixatrices d'azote associées à la rhizosphère sont de plus en plus utilisées dans les cultures des non légumineuses comme la betterave sucrière, la canne à sucre, le riz, le maïs, et le blé (Dobereiner, 1997; Hecht-Buchholz, 1998; Sahin et al., 2004).

Parmi les bactéries fixatrices d'azote non-symbiotiques les plus importantes appartiennent à plusieurs espèces : *Azoarcus* sp., *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum* sp., *Azotobacter* sp., *Achromobacter*, *Acetobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Azospirillum*, *Azomonas*, *Bacillus*, *Beijerinckia*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Derrxia*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Rhodospirillum*, *Rhodopseudomonas* et *Xanthobacter*. *Azospirillum* est le représentant des PGPR, ses capacités ont été évaluées dans des expériences à travers le monde (Burdman et al., 2000; Dobbelaere et al., 2003; Vessey, 2003; Lucy et al., 2004; Ramirez et Mellado, 2005).

De plus, des espèces de *Pseudomonas*, *Bacillus* (Glick et al., 1994a; Alam et al., 2001; Cakmakci et al., 2001; Kokalis-Burelle et al., 2002), et d'autres bactéries endophytiques telles que *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Burkholderia* et *Stenotrophomonas*, ont attiré l'attention de nombreux chercheurs ces dernières années en raison de leur association avec des cultures importantes et leur potentiel à améliorer la croissance des plantes (Chélius et Triplett, 2000; Verma et al., 2001; Dong et al., 2003; Ramirez et Mellado, 2005).

6.3.2 Solubilisation du Phosphate

L'amélioration de la fertilité du sol est l'une des stratégies les plus communes pour augmenter la production agricole. En plus de la fixation biologique de l'azote, la solubilisation des phosphates représente également un moyen important. Le phosphore (P) est un macronutriment essentiel pour la croissance et le développement des plantes mais aussi un important élément nutritif limitant cette croissance. Contrairement à l'azote, il n'existe pas de source biologique disponible (Ezawa et al., 2002).

Même dans les sols riches, la plupart du phosphore n'est pas disponible pour les plantes, une grande quantité se trouve sous forme insoluble. Les bactéries solubilisant le phosphate, PSB (Phosphate Solubilizing Bacteria) sont fréquentes dans la rhizosphère et peuvent être utilisées pour résoudre ce problème (Vessey, 2003). Les microorganismes permettent la disponibilité du P pour les plantes par minéralisation du P organique du sol et par solubilisation des phosphates précipités (Kucey et al., 1989; Pradhan et Sukla, 2005).

La capacité de quelques micro-organismes à convertir le phosphore insoluble en forme accessible est un trait important pour les PGPRs. Les bactéries rhizosphériques solubilisant le phosphate pourraient être une source prometteuse comme agent bio fertilisant dans l'agriculture (Sharma et al., 2007).

Le principal mécanisme de solubilisation des phosphates est la production d'acides organiques. Les acides gluconiques et 2-cétogluconique sont les plus fréquemment rencontrés. La libération de ces acides mobilisant le phosphore par l'intermédiaire d'interactions ioniques avec les cations du sel, de phosphate conduisent à l'acidification des cellules microbiennes et de leur environnement et par conséquent la libération du phosphate sous forme ionique. La libération des groupements phosphates liés à la matière organique est assurée par l'action des phosphatases (Kumar et Narula 1999; Whitelaw, 2000; Gyaneshwar et al., 2002).

Parmi les communautés bactériennes du sol, les espèces de *Bacillus*, *Enterobacter*, *Erwinia* et *Pseudomonas* spp. (Subbarao, 1988 ; Kucey et al., 1989). *B. megaterium*, *B. polymyxa*, *B. circulans*, *B. coagulans*, *B. subtilis*, *B. sircalmous* sont les plus performantes dans la solubilisation des phosphates (Podile et Kishore, 2006).

7 Bio régulation

Au cours des dernières années, un nouveau mécanisme de promotion de la croissance des plantes impliquant l'éthylène est proposé (Burdman *et al.*, 2000). Certaines PGPR produisent de l'ACC désaminase, une enzyme qui pourrait cliver l'ACC, le précurseur immédiat de l'éthylène dans la voie de biosynthèse de l'éthylène chez les plantes. L'activité de l'ACC désaminase diminuerait la production d'éthylène (qui affecte négativement de nombreuses étapes physiologiques des plantes : Une augmentation de la production d'éthylène agissant comme hormone sensitive stimule la maturation des fruits et le vieillissement des fleurs. Ces symptômes sont associés à une perte de la chlorophylle des feuilles, une dégradation des protéines et des ARN et une perte de pigmentation des fleurs (Oldroyd *et al.*, 2001; VanLoon *et al.*, 2006) et favoriserait un allongement des racines.

7.1 Synthèse (hormone, enzyme)

Plusieurs étapes de la croissance et du développement des plantes telles que l'élongation et la division cellulaires, la différenciation tissulaire, et la dominance apicale sont régulées par des hormones. De nombreuses phytohormones sont produites par les PGPR. Bien que le rôle de la biosynthèse de ces phytohormones par ces micro-organismes ne soit pas entièrement expliquée, il est à noter que les mécanismes directs des PGPR sur la croissance des plantes comprennent la production d'hormones telles les auxines, les cytokinines, les acides gibbérelliques et l'abaissement du taux d'éthylène chez la plante (Costacurta et Vanderleyden 1995 ; Glick, 1995; Lucy *et al.*, 2004).

Les régulateurs de croissance des végétaux sont les substances qui influencent les processus physiologiques de la plante à de très faibles concentrations et modifient ou contrôlent un ou plusieurs événements spécifiques du métabolisme d'une plante. Les hormones végétales sont des signaux chimiques affectant la capacité de la plante à réagir à son environnement. Sans compter qu'elles jouent un rôle important dans la réponse de la plante aux stress biotiques et abiotiques.

7.2 Enzyme (ACC-désaminase)

Le rôle de l'ACC désaminase chez les PGPR est actuellement bien établi. Elle intervient dans la régulation de l'éthylène chez les plantes. Les PGPR s'attachent aux racines et métabolisent les exsudats racinaires tels que le tryptophane et le transforment en auxines particulièrement en AIA. Cet AIA rhizobactérien ainsi que l'AIA endogène de la plante peuvent induire l'activité de l'ACC-synthase qui produit de l'ACC (Penrose et Glick, 2001). Une partie de l'ACC de la plante est excrétée et dégradée par l'ACC-désaminase des rhizobactéries en ammoniacque et α -cétobutyrate, composés rapidement métabolisés par les bactéries (Holguin et Glick, 2001), par conséquent la diminution de l'ACC entraîne l'abaissement du taux d'éthylène dans la plante.

7.3 Promotion des plantes sous stress biotique/ abiotique

En raison de leur nature sensible, les plantes ont depuis toujours été confrontées à différents stress abiotiques et biotiques dans leur environnement immédiat. Par conséquent, la survie des plantes dépend de leur capacité à adapter leur physiologie et notamment leur développement et leur croissance, afin d'atténuer ou même de supprimer les effets du stress. Toutes les plantes sont connues pour percevoir et réagir aux signaux de stress comme la sécheresse, la chaleur, la salinité, les herbivores et les pathogènes (Bartels et Sunkar, 2005). Le rôle des bactéries dans la tolérance des plantes aux stress

Même si ce rôle n'est pas évident au premier abord, les plantes cultivées dans le sol sont immergées au milieu d'une multitude de microorganismes. En fait, un gramme de sol contient des milliards de microbes, et de nombreux agents pathogènes microbiens exploitent cette relation étroite à leurs avantages, donnant lieu à des maladies bien connues et la perte de la productivité agricole chaque année.

Cependant, les plantes aussi façonnent leur environnement microbien et peuvent interagir avec divers micro-organismes bénéfiques. Ces interactions peuvent améliorer la croissance des plantes et aident la plante à résister à des conditions de stress biotiques et abiotiques. Les plus connus sont les interactions microbiennes bénéfiques avec les champignons mycorhiziens et les bactéries rhizobium. 80% de toutes les espèces de plantes terrestres forment des relations symbiotiques avec les mycorhizes (Harrison, 2005).

Des associations bénéfiques avec d'autres microorganismes existent à la fois pour diverses espèces bactériennes, généralement appelée PGPB ainsi que de divers champignons, désignées par PGPF (Plant Growth-Promoting Fungi). PGPB et PGPF peuvent stimuler la croissance des plantes et / ou conférer aux plantes une meilleure résistance aux stress biotiques

et abiotiques (Lugtenberg et Kamilova 2009). La mise en place de véritables interactions nécessite la reconnaissance mutuelle des réponses à la fois chez les plantes et les microorganismes. Récemment, il s'est avéré que *Rhizobium* et champignons partagent une voie de signalisation des plantes qui est activée par des facteurs de *Rhizobium* et champignons (Oldroyd et al., 2009).

En outre, cette voie de signalisation semble également être activée par certaines bactéries bénéfiques (PGPR) (Sanchez et al., 2005).

Tolérance aux stress abiotiques induite par des bactéries bénéfiques

Un certain nombre de bactéries peuvent également favoriser la croissance des plantes et les protéger contre des stress abiotiques, ce qui a donné lieu à une recherche active dans le domaine des bactéries améliorant la croissance végétale. Différentes familles de bactéries, y compris les *Rhizobium*, *Bacillus*, *Pseudomonas* et *Burkholderia* peuvent améliorer la croissance des légumineuses et des cultures dans des conditions de stress abiotique (Egamberdieva et Kucharova, 2009).

L'accumulation de la proline chez la plante est provoquée par le stress engendré par la sécheresse. L'amélioration de la tolérance au stress abiotique du maïs lors de la co-inoculation de *Rhizobium* et *Pseudomonas* est accompagnée par une augmentation des niveaux de proline, une diminution des fuites d'électrolytes et par le maintien de la teneur en eau des feuilles (Egamberdieva et Kucharova, 2009).

Les contraintes environnementales peuvent être la cause de la production d'éthylène hormonal chez les plantes, qui se traduit par des réactions d'inhibition de la croissance et du stress. Habituellement, l'éthylène est formé dans les plantes à partir du précurseur acide 1-aminocyclopropane-1-carboxyle (ACC). Certaines bactéries produisent des ACC désaminases, qui dégradent l'ACC, réduisant ainsi la formation d'éthylène dans les plantes. C'est de cette manière qu'*Achromobacter piechaudii* induit une tolérance systémique contre la sécheresse et le sel et favorise la croissance des plantes (Glick, 2007).

8 production de HCN

Selon Voisard et al. (1989), la production d'acide cyanhydrique (HCN) par la souche de *P. fluorescens* CHA5 est nécessaire à la défense de la plante vis-à-vis de l'agent de la pourriture noire du tabac. Ce mécanisme est de moindre importance avec la souche Cha77. L'HCN produit dans la rhizosphère activerait des réactions de défense de la plante, ce qui correspond à un mécanisme indirect de protection. (Meena et al., 2001)

Partie expérimentale

Matériels et méthodes

VI. Matériels et méthodes

9 Isolement des bactéries du sol :

L'isolement des bactéries de genre *Pseudomonas* a été réalisé à partir de quatre échantillons des sols rhizosphériques oasiens. Chaque échantillon a été passé par une série de suspensions diluées jusqu'à la 5^{ème} dilution selon le protocole expérimental décrit par Delarras en 2007. Un volume de 20 µl a été pris de la 3^{ème} et la 4^{ème} dilution et ensemencé sur des boîtes pétries à milieu de culture King B (Voir l'annexe n°) gélosé. Les boîtes pétries ont été incubées dans une température 30°C pendant 24 h.

10 L'observation macroscopique :

L'observation macroscopique des cultures est le premier examen effectué après de l'isolement après incubation. Elle consiste à l'aspect et la couleur de la colonie pour sélectionner des isolats à repiquer et purifier.

Il ne pourra être décrit convenablement qu'à partir de colonies bien isolées les colonies sont d'autant plus petites qu'elles sont rapprochées.

Pour isoler les colonies ciblées de groupe *Pseudomonas* en basant sur la couleur jeune verdâtre autour des colonies et la fluorescence produite par les bactéries *Pseudomonas*

Dans cette observation on a utilisé un microscope x1000 pour confirmer les caractéristiques morphologiques de *Pseudomonas*, il s'agit de la forme des bacilles, ce dernier est bâtonnet rigide, droit, avec des extrémités arrondies

11 La purification

Plusieurs repiquages successifs ont été effectués sur milieu solide jusqu'à l'obtention des colonies bien distinctes et homogènes. La purification des souches sur milieu gélosé se fait par la méthode d'ensemencement par épuisement.

12 La Coloration de Gram :

La coloration de Gram est une coloration différentielle permettant de classer les bactéries en deux groupes selon la structure de leur paroi : Gram positif et Gram négatif. En effet, quand la

bactérie est mise au contact du violet de gentiane et ensuite soumises à l'action du lugol, il se forme un complexe colorant qui colore en violet tout le cytoplasme des bactéries. Cependant lorsque ces bactéries colorées sont lavées à l'alcool, seules celles à Gram négatif (présence de membrane externe et couche mince de peptidoglycane), qui perdent leur coloration et prennent la couleur rose après la coloration par la fushine. Les bactéries à Gram positif possèdent une couche épaisse de peptidoglycane qui empêche la pénétration de l'alcool et donc restent en couleur violette. Le protocole est le suivant :

- Déposer une goutte d'eau physiologique stérile à l'aide d'une pipette Pasteur stérile sur une lame bien propre.
- Prélever une colonie bien isolée avec une pipette Pasteur boutonnée et la dissocier dans la goutte d'eau. Le frottis obtenu est séché dans l'étuve.
- Recouvrir totalement avec du violet de gentiane pendant 1 min, rincer ensuite à l'eau de robinet. Le frottis est ensuite recouvert de lugol pendant 1 min.
- Décolorer par l'alcool et laver rapidement à l'eau du robinet. Le frottis est enfin recouvert de fushine pendant 30 secondes, puis lavé à l'eau, séché à température ambiante et fixé au bec benzène.
- Examiner le frottis au microscope optique à l'objectif 100 et à l'immersion à l'huile de cèdre. Après la coloration de Gram le *Pseudomonas aeruginosa* apparaît sous forme de bacilles colorés en rose.

13 Test de recherche d'oxydase:

L'activité oxydase du *Psudeomonas* peut être déterminée par la méthode des disques selon le protocole suivant :

À l'aide d'une pipette pasteur et à partir d'un milieu gélosé, une colonie est déposée sur un disque oxydase. La couleur bleu ou violet indique la présence de l'activité oxydase.

14 Texte de la catalase :

Ce test consiste à mettre une colonie prélevée d'une boîte pétrie à milieu gélosé à l'aide d'une anse sur une lame de vers puis ajouter de l'eau oxygénée, l'apparition de bulles d'air sur la colonie indique qu'elle possède de catalase.

15 Production de fluorescence :

Les isolats ayant l'activité oxydase et catalase, ont été passés en culture sur le milieu King B gélosé pour tester leur production de fluorescence, une couleur jaune ou verte diffusée autour des colonies.

16 Production de pyoverdine :

L'ensemencement sur le milieu King B gélosé, nous a donné des colonies jaunes verdâtres avec fluorescence verte ou vert foncé colonies.

17 Production de pyocyanine :

Les isolats ont été ensemencés sur un milieu King A gélosé, les colonies produisent une fluorescence bleue ou bleu foncé.

18 Production et extraction de phénazine :

La production des substances phénaziniques *in vitro* a été stimulée dans des Erlenmeyers contenant le milieu King B liquide

ensemencé par des colonies de *Pseudomonas* et mise en incubation à 30°C pendant 72 h. L'extraction des composés phénaziniques est faite selon la méthode décrite par (Bonsall *et al.* 1997).

Les cultures ont été centrifugées 10000 r/m, puis acidifiées à pH = 2 en ajoutant du HCl pur afin d'éliminer les protéines, puis l'extraction de phénazines a été faite suivant la méthode Smith (19..) avec de l'acétate d'éthyle (1v :1v, trois fois répétés). La phase organique collectée (supérieure), contenant les phénazines a été filtrée à travers un papier Whatman ; après l'addition de 0,5 g de sulfate de magnésium pour 100 ml de portion d'acétate d'éthyle, pour éliminer les traces de, ensuite le filtrat est concentré à sec par un rotavapor.

19 Production et extraction de pyocyanine :

Pseudomonas aeruginosa (OA47) est cultivée dans le milieu King A gélosé à 30°C pendant 24 h à l'obtenir bon croissance pour favorable destiné à la production de la substance recherché.

L'isolat OA47 a été incubé dans des tubes dont 3 ml de mileu King A à 30 °C pendant 24 h, puis les tubes ont été versé dans des erlenmeyers contenant 120 ml de King A, incubés dans 30 °C pendant 72 h avec l'agitation permanante 180r/m

Les cultures ont été centrifugées 10000 r/m, puis acidifiés à pH = 2 en ajoutant du HCl pur afin d'éliminer les protéines, puis l'extraction de phenazines a été faite suivant la méthode Smith (19..) avec de l'acétate d'éthyle (1v :1v, trois fois répétés). La phase organique colletctée (supérieur), contenant les phénazines a été filtrée à travers un papier waltman ; après l'addition de 0,5 g de sulfate de magnésium pour 100 ml de portion d'acétate d'éthyle, pour éliminer les traces de, ensuite le filtrat est concentré à sec par un rotavapor.

20 Production et extraction de la pyoverdine

Par la même méthode de Smith,(19..) utilisée pour la pyucynine, l'extraction de pyoverdine des OA44 ,OA45,OA47 et OB14 a été

21 Caractérisation de la pyoverdine

21.1 Analyse de l'extrait de pyoverdine par UV-Visible

L'extrait brut est balayé dans la gamme de 200 à 500 nm par un spectrophotomètre UV- Visible afin de déterminer la composition en fonction des maximums d'absorbance des substances phénaziniques (Veselova *et al.*, 2008).

21.2 Identification par chromatographie en couche mince (CCM)

Le fractionnement de l'extrait a été effectué par CCM sur gel de silice. Le volume de dépôt est de 30 µl et la phase mobile est constituée de chloroforme/acétate d'éthyle (1:1). Après migration et évaporation du solvant, les plaques sont visualisées sous UV à 365 nm. Les bandes ont été délimitées et les rapports frontaux sont calculés

(Rf).



Figure 1 test de CCM

21.3 Analyse de la pyoverdine par FTIR

L'analyse par infrarouge à transformation de fourrier (FTIR) a été utilisée dans le but de confirmer la structure exacte de nos échantillons.

22 Texte de résistance à la salinité

Le test a été réalisé avec un milieu de culture de king B liquide à différentes concentrations salines (Na Cl) à 50, 100 et 150 mM. Après l'ensemencement avec les cinq souches *Pseudomonas*, 60 tubes à essai à 5 ml de milieu de culture ont été déposés dans une étuve (incubateur-adjutateur) avec une température de 30C pendant 72 heures.

La croissance sera exprimée en valeur de la densité optique mesurée par un spectrophotomètre avec une longueur d'onde de 800 nm.

23 Tolérance au cuivre

Le test a été réalisé avec un milieu de culture de king B liquide à différentes concentrations cuivre (CuS5H2O) à 2.5 , 5, et 10 mM. Après l'ensemencement avec les cinq souches

Pseudomonas, 60 tubes à essai à 5 ml de milieu de culture ont été déposés dans une étuve (incubateur-adjutateur) avec une température de 30C pendant 72 heures.

La croissance sera exprimée en valeur de la densité optique mesurée par un spectrophotomètre avec une longueur d'onde de 800 nm.

24 antagonistes

le test consiste à ensemencer six souches pathogènes à pouvoir antagoniste sur la surface des boites, les souches ont été déposés en ensemencement étalé. Après, des disques de diffusion stériles de 5 mm de diamètre imbibés dans des solutions bactériennes des isolats ont été déposés à l'aide d'une pince flambée sur la surface.

Après l'incubation pendant 48 h à 30°C, La lecture des résultats consiste à mesurer la distance des zones d'inhibition entre le disque d'isolat testé et la souche antagoniste.

25 Test d'antibiogramme

Ce teste a été réalisée par la méthode des disques de diffusion. Cette méthode est appliquée sur le milieu king B gélosé dans des boites Pétri ensemencé à la surface avec six souches antagonistes. des disques de 5 mm de diamètre imbibés dans l'extrait de la pyoverdine délué (20 µl dans 2 ml de méthanol) sont déposés à l'aide d'une pince flambée sur la surface du milieu ensemencé. Celles-ci sont incubées à 30 °C pendant 24h

26 Test de solubilisation de phosphate

La solubilisation de phosphate inorganique est déterminée qualitativement sur le milieu de culture de Pikovskaya agar(Annexe1), additionné de tricalcium phosphate comme une source insoluble de phosphate. Les souches sélectionnées promotrices de la

croissance (OB14, OA44, OA45 etOA47) sont ont été ensemencées en pic central, puis incubée à une température de 30°C pendant 7 jours. Une lecture positive de la solubilisation du phosphate se manifesté par la formation d'une zone claire autours des colonies (Alam et al., 2002). La mesure de l'index de solubilisation du phosphore est effectuée selon la formule suivante.

Sph = $\frac{\text{diametre de la zone claire} - \text{diametre de disque}}{2}$

Sph (solubilisation phosphate) : Index de solubilisation.

SP= diamètre de colonie + dia. De zone claire /dia de colonie

27 Production d'acide cyanhydrique (HCN)

La méthode de Soltani *et al.*, (2012) a été utilisée pour tester la production de l'acide cyanhydrique (HCN), chaque isolat a été ensemencé par étalement sur la surface de la gélose nutritif additionné de 4,4 g/l de glycine, un papier filtre wattman n°1 trempé dans une solution de Na₂CO₃ à 2% dans l'acide picrique à 0,5% a été déposé sur le couvercle de la boîte, ensuite les boîtes ont été scellées avec du parafilm et incubées à 28± 2 °C pendant 4 jours.

Le développement de la couleur orange-marron indique la production de l'acide cyanhydrique.

28 Production de IAA.

Selon la méthode décrite par Loper et Schroth (1986), des cultures de 5 ml en tube sur king B liquide additionné par 0.1 % de tryptophane ont été réalisé avec une température de 31 °C, les cultures ont été centrifugés (10000 r/m pendant 15 minutes) et filtrés à l'aide de papier filtre 22 µm pour débarrasser la masse bactérienne.

1 ml du surnagent et ajouté à 2 ml de solution Salkowski (2% de solution FeI₃ à 0.5 M + 98% d'acide perchlorique à 35%, 1v :50v). Les solutions ont été mise en obscurité pendant 25 minutes, le changement de la couleur vers le rose indique la production de IAA.



Figure 2 Trois concentrations de cuivre

Résultats et discussion

VII. Résultats et discussion

29 Isolement des souches de groupe Pseudomonas.

Dans cette partie, les opérations d'isolement et de sélection des bactéries rhizosphériques ont été réalisées par ensemencement des souches isolées à partir différents échantillons des sols rhizosphériques oisiens sur le milieu de culture king B.

Parmi les espèces isolées, on a sélectionné certaines isolats selon l'aspect visqueux et la couleur jaune verdâtre.

30 L'observation microscopique :

L'examen microscopique vient pour la mise en évidence de la forme des différents isolats de forme de bacilles de grande ou de petite taille et parfois coccobacilles sur gélose king B. la sélection des bacilles c'était le but de cet examen.

31 Coloration de Gram

Les isolats de forme de bacilles sélectionnées ont subi un test de coloration de gram, cinquantes isolats des bacilles à Gram négatif ont été sélectionnées.

Isolat	Forme	Coloration de gram
OB13	Bacille	-
OB14	Bacille	-
OA44	Bacille	-
OA45	Bacille	-
OA47	Bacille	-

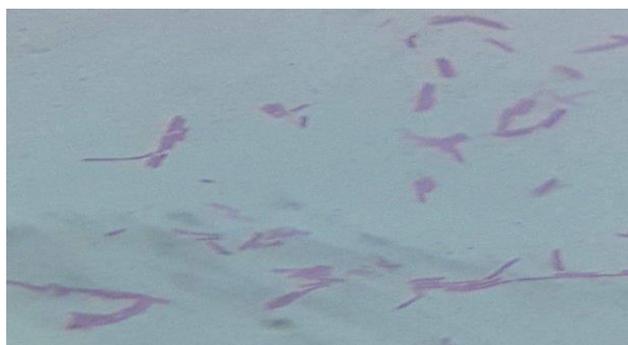


Figure 3 examen microscopique

32 Test de recherche oxydase et catalase.

A fin de se rapprocher des souches au groupe de *Pseudomonas* fluorescents, on a procéder à la sélection de trentaines isolats à tests positifs de l'oxydase et de catalase.

33 Texte oxydase.

Ce test consiste à mettre en évidence l'actévitité enzymatique cytochrome oxydase des bactéries, un disque est placé sur une lame, puis une colonie y est déposée avec une pipette pasteur. S'il y a apparition d'une tache blue ou violette au bout de 30 secondes, la bactérie est oxydase+ et elle possède le cytochrome oxydase, les résultats de ce test sur les différentes souches sont figués dans le tableau n°..

Tableau 1 Résultats de quelques tests oxydase

Bactéries	Résultats
OB14	+
OB13	+
OA44	+
OA45	+
OA47	+

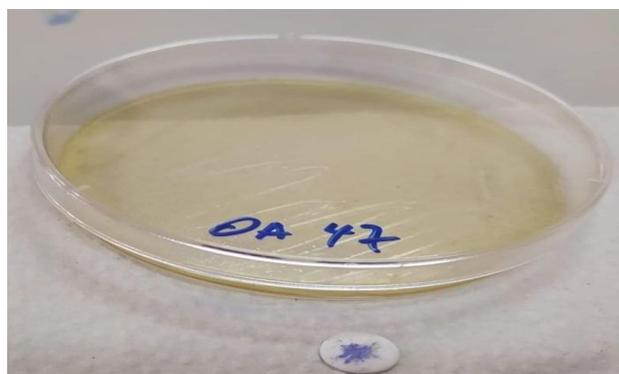


Figure 4 Résultats de quelques tests oxydase

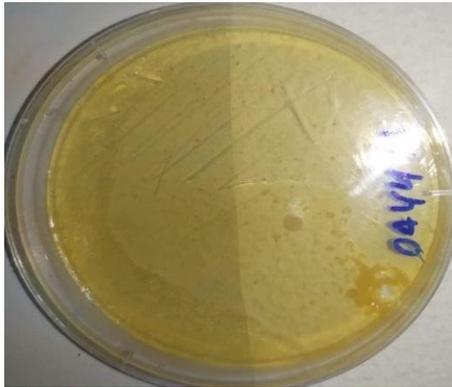
34 Test de catalase

Ce test consiste à d'ajouter deux gouttes d'eau oxygéné H₂O₂, sur une frotte de colonie fraîches, l'apparition des bulles d'air indique l'activité de catalase chez la bactérie.

35 Production de fluorescence :

La production de fluorescence, une couleur jaune ou verte diffusée autour des colonies

Tableau 2 Résultats de quelques tests catalase



Bactéries	Résultats
OB14	+
OB13	+
OA44	+
OA45	+
OA47	+

Figure 5 Production de fluorescence

36 Production et quantifaication de pyoverdine :

Les résultats de test production de la pyoverdine des isolats de *Pseudomonas* OB13,OB14 ,OA44, OA45 et OA47 montrent une variation en pouvoir de production entre



Figure 6 Production et quantifaication de pyoverdine les 5 souche

37 Production de pyocyanine :

La production de la pyocyanine chez la souche de *Pseudomonas* OA47 est estimé par le spectrophotomètre visible



Figure 7 Production de pyocyanine le souch OA47

38 Caractérisation de la pyoverdine

38.1 Analyse de l'extrait de pyoverdine par UV-Visible

L'analyse spectrale UV-Visible (Figure) montre que le spectre d'absorption de l'extrait obtenue à un seul pic dans la partie visible (400nm), caractéristique de la couleur jaune verdâtre de la pyoverdine produite par les *Pseudomonas fluorescents*

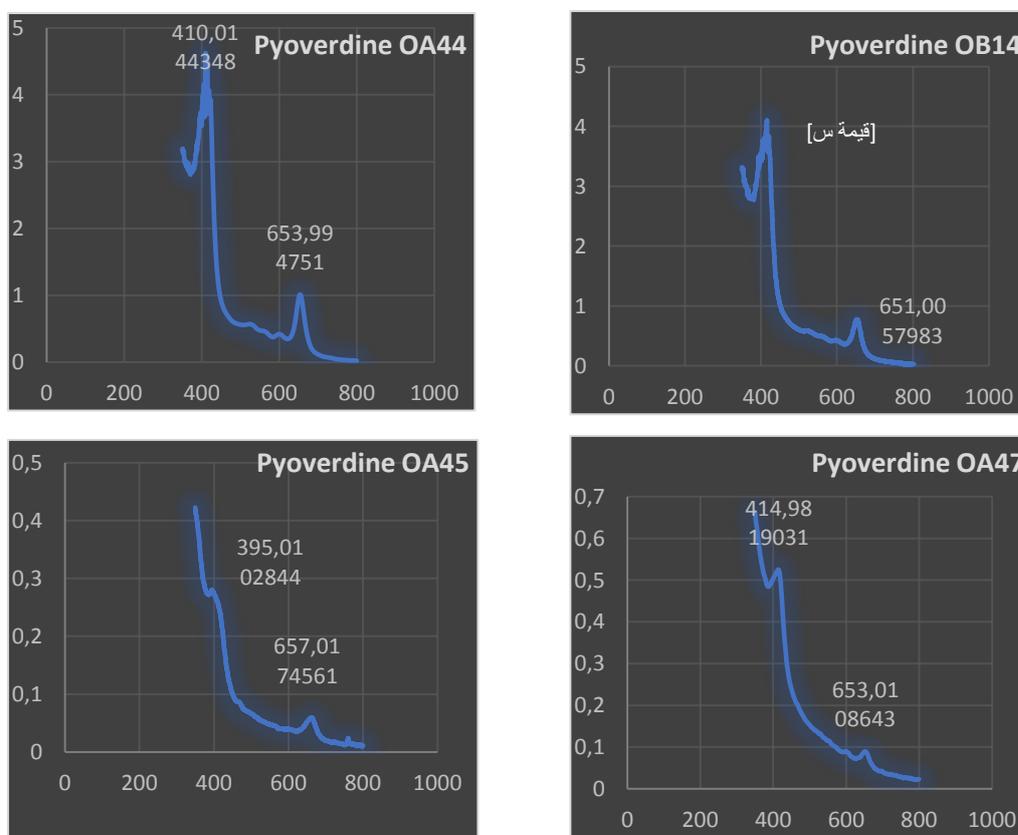


Figure 8 Spectres d'analyse UV-Visibles des pyoverdines.

Les spectres UV-Vis d'analyse des pyoverdines affiche de pics caractéristiques, la première est entre 393 et 415 nm et la deuxième entre 650 et 616 nm.

38.2 Identification par chromatographie en couche mince (CCM)

L'extrait de la pyoverdine a révélé la présence d'une seule tache de couleur bleu

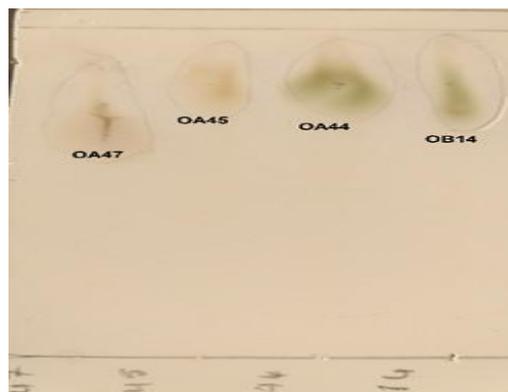
identique avec celle du standard (avec un rapport frontal égale à 0.90) (Fig.). Ces résultats sont en concordance avec les travaux de Sudhakar *et al.*(2013) mais avec un rapport frontal différent à cause de la nature de la phase mobile utilisée.

Distance fixe = 7.3

Tableau 3 valeur de test CCM

Souche	valeur
OA47	0,753425
OA45	0,821918
OA44	0,821918
OB14	0,835616

Figure 9 Par chromatographie sur couche mince CCM.



38.3 Analyse de la pyoverdine par FTIR

Le spectre IR obtenu représente les vibrations caractéristiques des différentes liaisons constituant la structure de la molécule de la pyoverdine et les positions des fonctions OH (Fig 11). La majorité des pics apparaissent dans le domaine 400 à 4000 cm^{-1} . Suivant les bandes d'absorption, les molécules ont presque la même structure avec petit détail en en position,

- 1- Une bande large et intense à 3430 cm^{-1} , due à la liaison hydrogène O-H

Tableau 4 : Référence d'identification par analyse par FTIR

Absorbance Range (cm^{-1})	Functional Group	Class of Compound	Present Study CT ratio 0.1	Present Study CT ratio 0.15
4400-4670	C-H	Aliphatic	4385-4667	4377-4475
4000-4350	C-H	Aromatic	4007-4328	4065-4329
3670-4000	O-H	Hydroxyl group	3681-3938	3677-3943
2000-2700	C=C, C=N	Alkynes, Aliphatic Nitrites	2047-2246	2046-2358
1750-2000	C=O	Carboxylic Acid	1802-1939	1795-1991

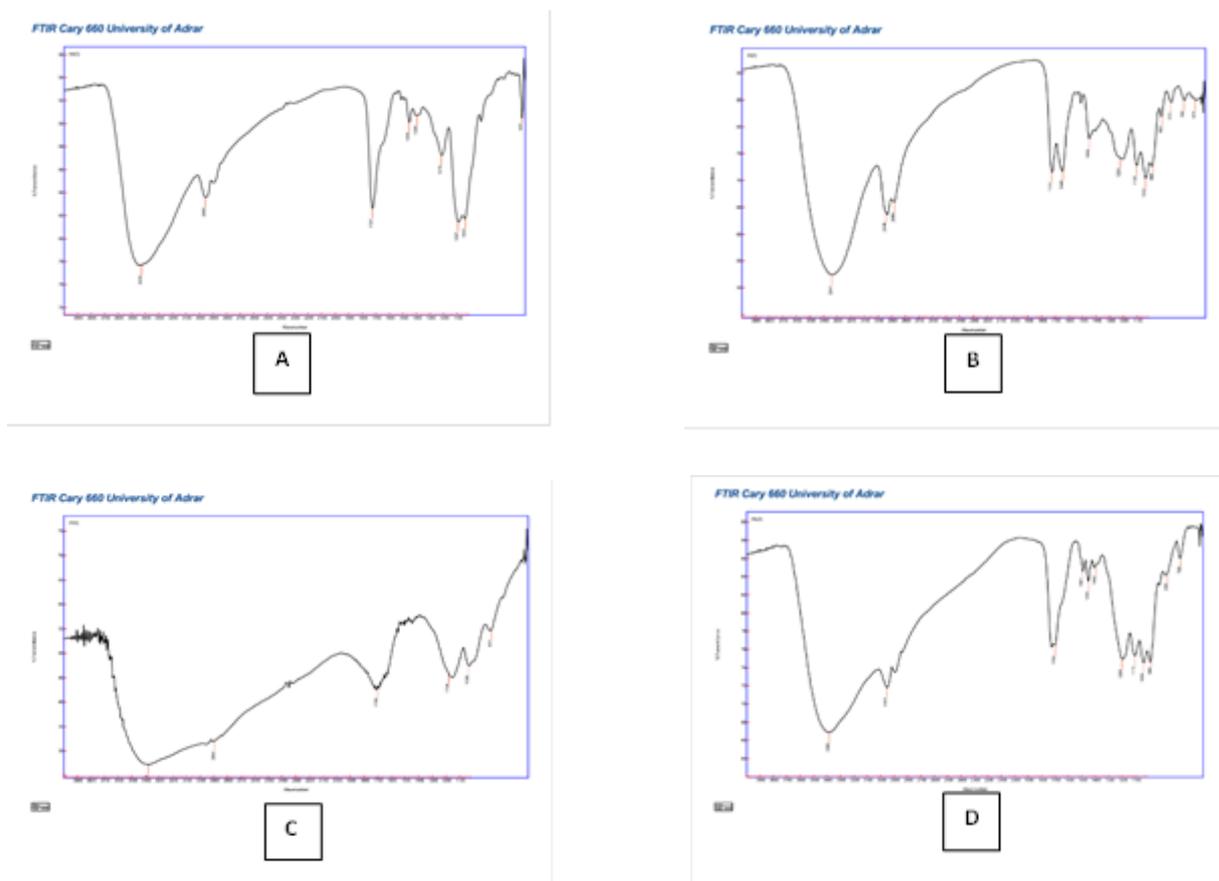


Figure 10 Par photomètre infra-rouge FT-IR

38.4 Par résonance magnétique nucléaire RMN.

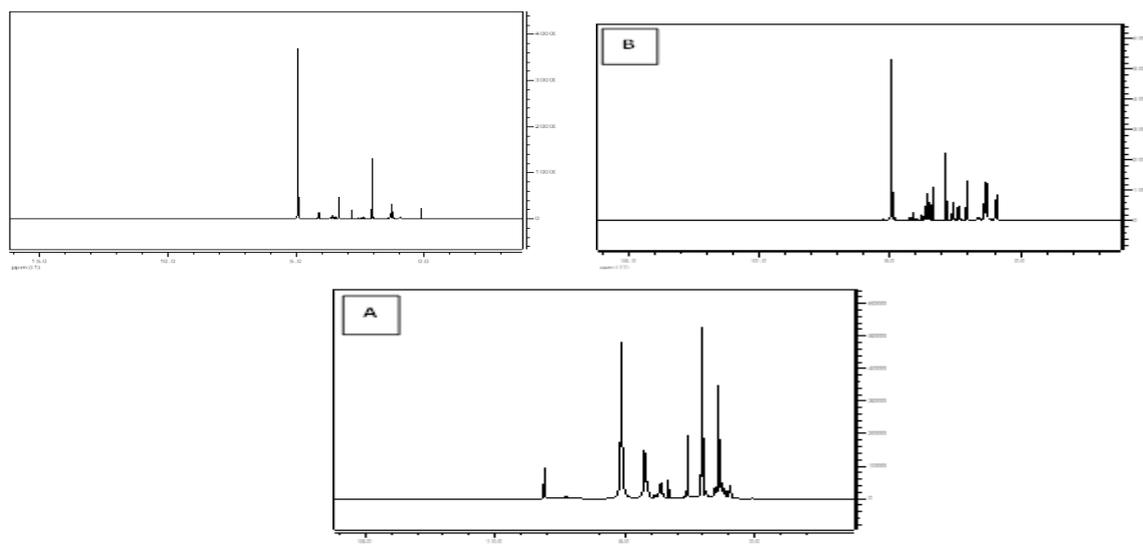


Figure 11 Spectre d'analyse par résonance magnétique nucléaire RMN

39 Test de résistance à la salinité.

Les résultats obtenus par le spectrophotometre à 600 nm sont configurés au tableau suivant.

Tableau 5 absorbances des milieux de culture de test de résistance à la salinité des bactéries

Souches	S3	S2	S1	S0
OA44	0,58433333	0,35833333	0,57	0,569
OA45	0,54266667	0,65333333	0,57	0,60366667
OA47	0,68433333	0,69266667	0,63133333	0,83933333
OB13	0,474	0,18533333	0,095	0,28166667
OB14	0,53433333	0,625	0,66866667	0,46433333

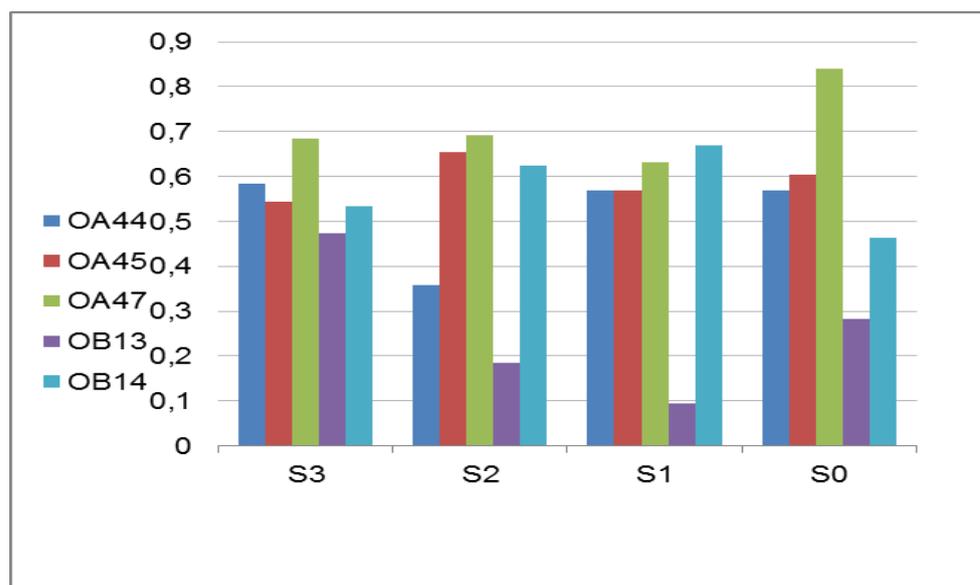


Figure 12 absorbances des milieux de culture de test de résistance à la salinité

D'après le tableau, il nous apparaît clairement que l'échantillon le plus résistant à la salinité est OA47, qui a pu se reproduire dans les trois concentrations différentes, ainsi que les autres échantillons dans des proportions variables

40 Tolérance au cuivre

Tableau 6 absorbances des milieux de culture de test de résistance à la cuivre

Souches	C3	C2	C1	C0
OA44	1,134	0,56033333	0,60266667	0,931
OA45	0,168	0,495	0,69533333	0,74233333
OA47	1,118	0,57266667	0,52233333	0,82166667
OB13	0,15633333	0,16066667	0,16766667	0,83133333
OB14	1,51066667	1,01466667	0,41133333	1,06066667

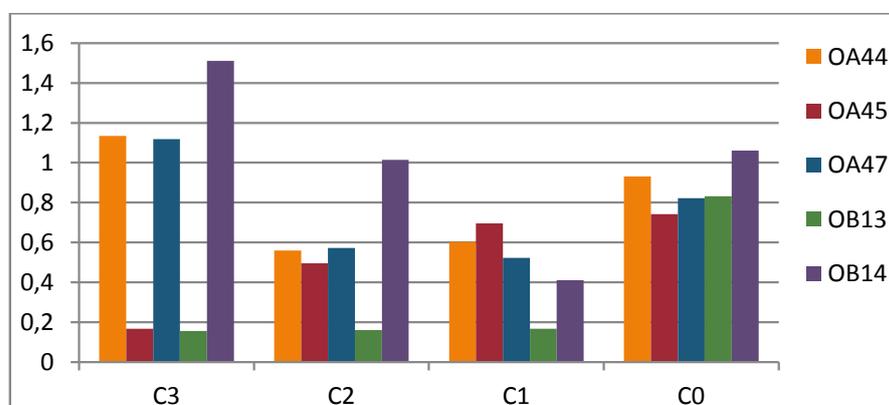


Figure 13 absorbances des milieux de culture de test de résistance à la cuivre

D'après le tableau, il est clair pour nous que tous les échantillons ont pu se reproduire dans les trois concentrations différentes de cuivre dans des proportions variables

41 Test d'antagonisme

Les résultats de test d'antagonisme montre la supériorité de la souche OA47 sur l'ensemble souches pathogènes antagonistes, et isolats testés.

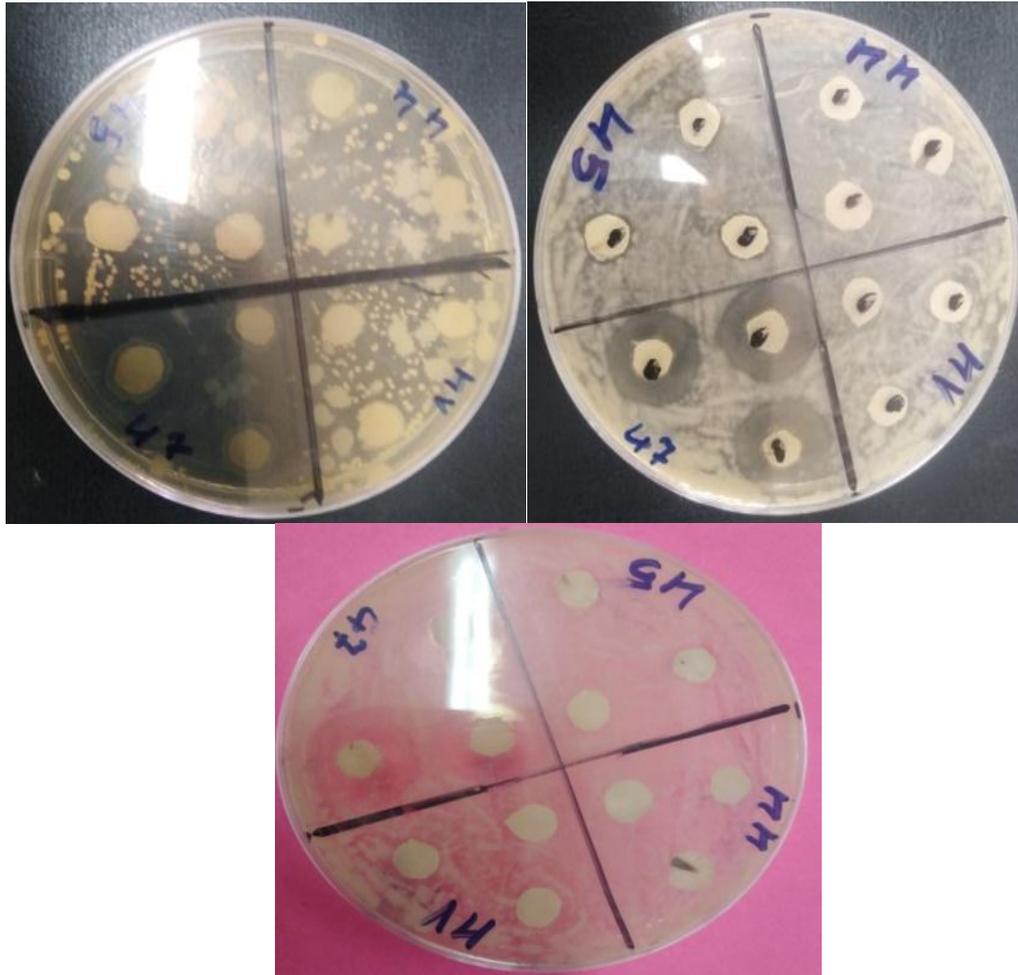


Figure 14 : Les zones d'inhibitions de l'activité antagoniste

Tableau 7 La distance entre l'échantillon d'agent pathogène et seuch

	OA47	OA45	OA44	OB14
S1	0,48333333	0,21666667	0,05	0,15
S3	0,31666667	0,05	0	0
S4	0,66666667	0	0	0
S6	1,03333333	0,43333333	0,4	0
C1	0,86666667	0	0	0
C2	0,65	0	0	0

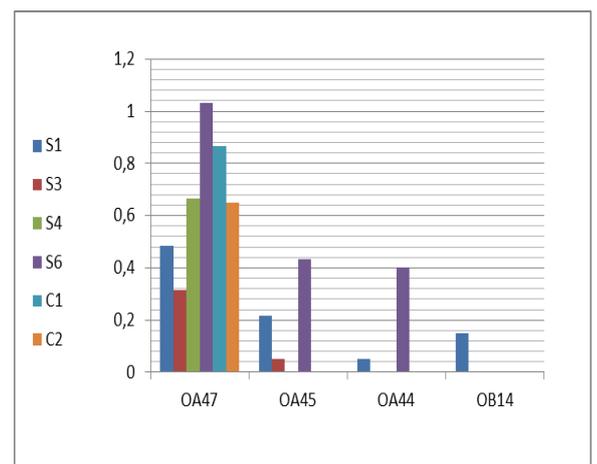


Figure 15 test antagonisme

42 Test d'antibiogramme

les extraits les plus inhibiteur aux agents pathogènes sont, respectivement, OA47, OA45, OA44 et OB14. La comparaison de ces résultats avec celles de test d'antagonisme montre une similarité d'effet, ce que nous conduisissent à conclure que les isolats testés influent par l'implication de pyoverdine.

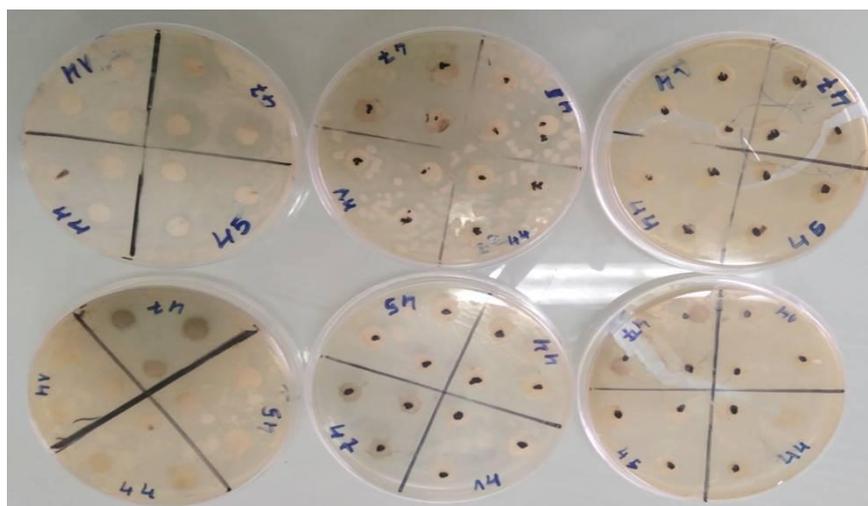


Figure 16 Test extrait pyoverdine des souch OB14.OA44.OA45.OA47

Tableau 8 test d'antibiogramme des extraits de pyoverdine

	OA47	OA45	OA44	OB14
S1	0,98333333	0	0	0,05
S3	0,21666667	0	0	0
S4	0,96666667	0,13333333	0,03333333	0,1
S6	0,06666667	0	0	0
C1	0,37333333	0	0	0
C2	1,1	0,66666667	0,36666667	0,23333333

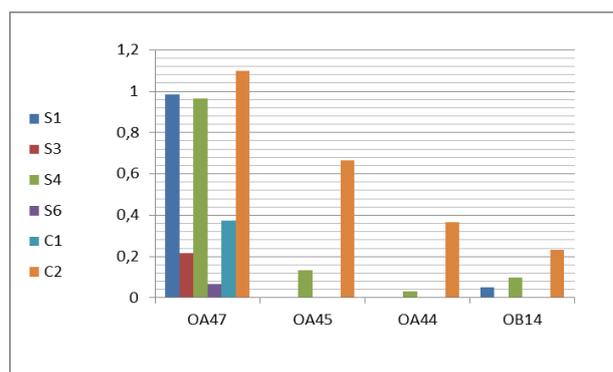


Figure 17 Test d'antibiogramme des extraits de pyoverdines

43 Test de solubilisation de phosphate

La solubilisation de phosphate est observé sur deux isolats OA47 et OB14 avec une superiorité de l'isolat OA47. Alors que l'isolats OA44 et OA45 n'ont pas montré ce pouvoir de solubilisation (Tableau n°9).

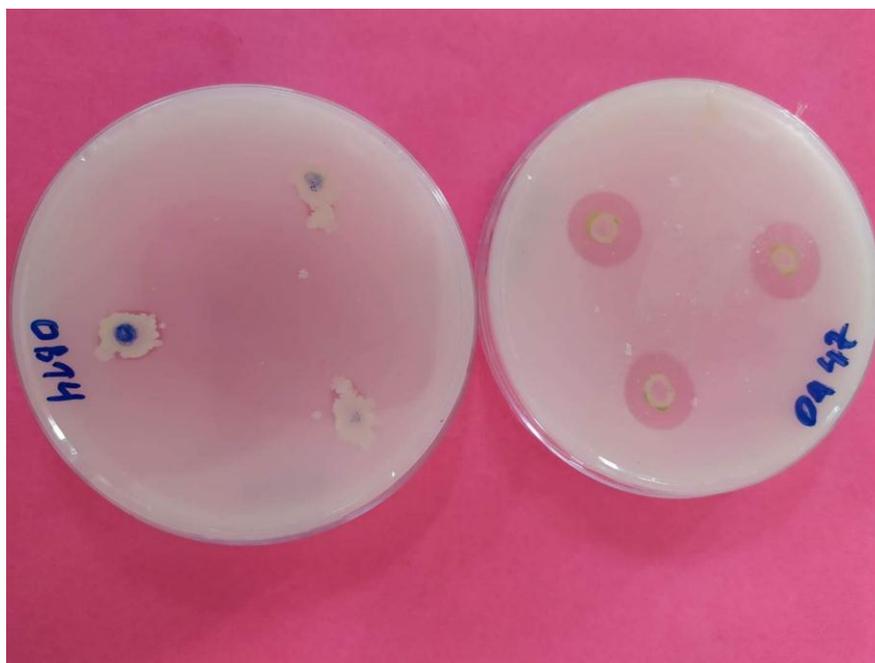


Figure 18 test de solubilisation de phosphate sur deux isoltas OA47 et OB14

Tableau 9 Zone d'inihhibition de extraits

OB14	OA44	OA45	OA47
0,2	0	0	0,5

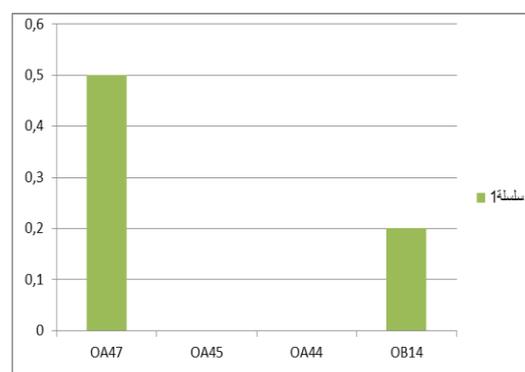


Figure 19 Zone d'inihhibition de extraits

44 Acide Cyanhydrique (HCN)

Le vouvoir de Production d'acide cyanhydrique est manifesté sur toutes les isolats *Pseudomonas* OB13, OB14, OA44, OA45 et OA47 par l'apparition de la Couleur jaune orangé.

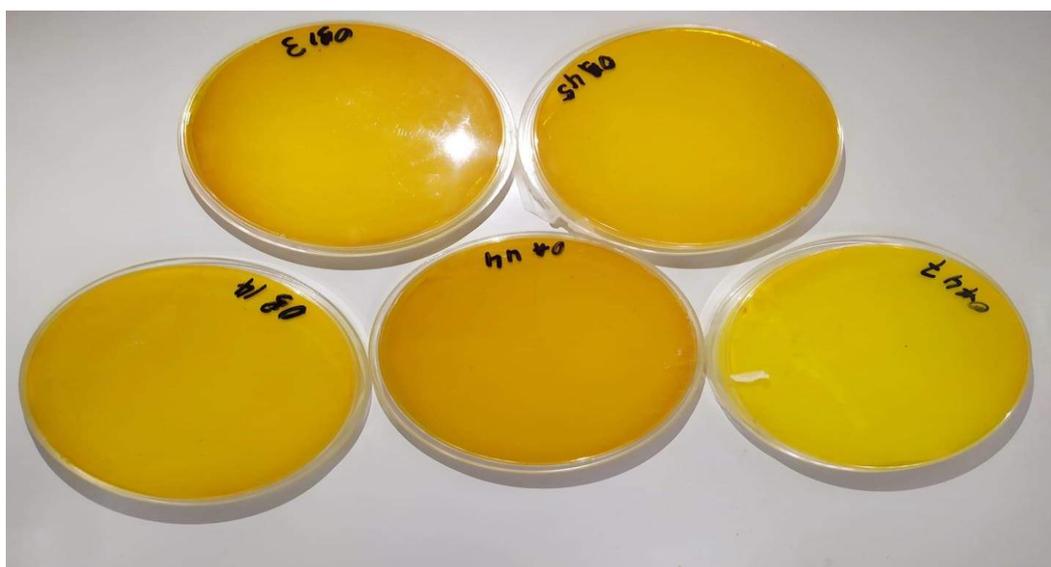


Figure 20 test de HCN pour 5 souche

45 Production de IAA.

Tableau 10 : Effet de salinité et de cuivre sur la production de IAA dans des milieux

Souche	Salinité				Cuivre			
	S0	S1	S2	S3	C0	C1	C2	C3
OA44	5.330	14.127	2.827	2.523	4.044	3.546	4.251	4.058
OA45	2.301	2.094	0.711	0.365	4.805	3.269	5.220	5.040
OA47	2.495	5.635	4.251	4.998	3.256	3.076	3.435	2.993
OB14	1.264	0.240	0.545	0.406	10.296	9.480	11.665	11.264
OB13	1.554	1.264	1.098	1.582	4.611	5.427	5.358	5.192

À travers la déclaration, nous notons que la salinité a affecté la production d'IAA à différentes concentrations, tandis que dans différentes concentrations de solution de cuivre production de IAA à des degrés divers, et le cuivre est considéré ici comme un catalyseur

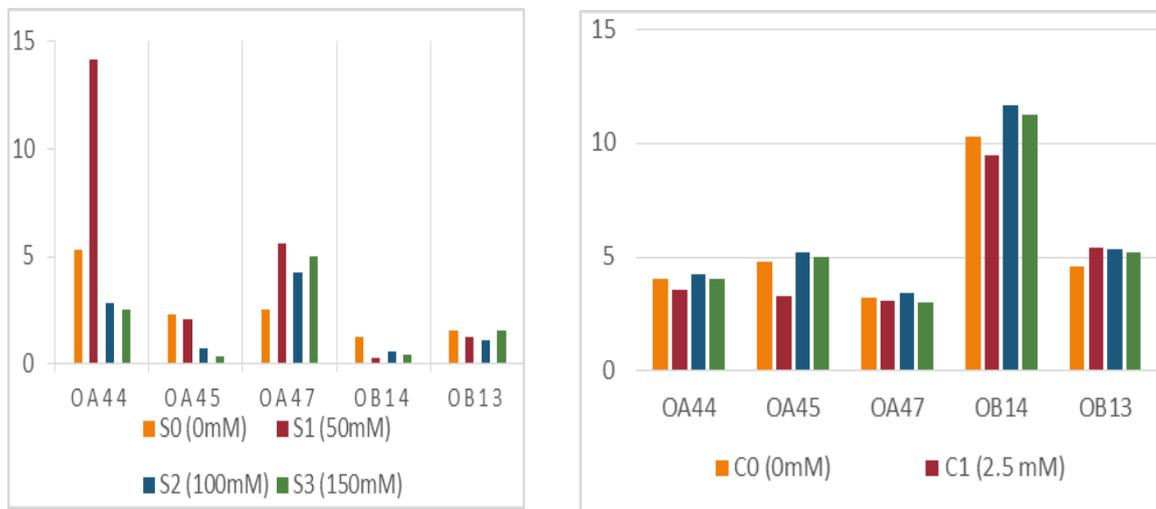


Figure 21 Effet de salinité et de cuivre sur la production de IAA dans des milieux liquides

Conclusion général

Conclusion

La rhizosphère est la région du sol directement formée et influencée par les racines et les micro-organismes associés, cet environnement particulier comprend une microflore microbienne qui inclut autant des micro-organismes bénéfiques que actifs. Certaines bactéries du sol ont la capacité de favoriser le développement des cultures agricoles en stimulant leur croissance à travers la production de métabolites de leur fonctionnement ou en évaluant les dommages causés par les agents responsables.

Dans ce travail, on a étudié quelques souches bactériennes isolées de rhizosphère, en caractérisant leurs propriétés morphologiques (Gram, formes des bactéries et leur mode de regroupement), ensuite, une caractérisation des deux types d'enzymes respiratoires a été réalisée (Catalase et Oxydase) et enfin ; nous avons déterminé parmi les souches testées, celles qui ont la capacité de solubiliser le phosphate, de produire l'auxine, on a également examiné leurs potentialité de production de sidérophores (pyoverdine, pyocyanine et phenazine) ,puis analysé par différents méthodes spectrales et caractérisé. Parmi les souches étudiées, OA47 est la plus performante en terme de production des métabolites associés et de résistance aux stress salin et cuprique.

En perspectives, nous envisageons de caractériser les métabolites secondaires des ces isolats, et chercher les différents mécanisme d'action pour la promotion de croissance des plantes

Références Bibliographiques

Les références bibliographiques

Ahmad, F., Ahmad, I., Khan, M. S. (2008). Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. *Microbiological research*, 163(2), 173-181.

Albacete, A., Ghanem, M. E., Martínez-Andújar, C., Acosta, M., Sánchez-Bravo, J., Martínez, V., et al., (2008). Hormonal changes in relation to biomass partitioning and shoot growth impairment in salinized tomato (*Solanum lycopersicum* L.) plants. *Journal of Experimental Botany*, 59(15), 4119-4131.

Ashrafuzzaman, M., F.A. Hossen., M.R. Ismail., M.A. Hoque., M.Z. Islam ., S.M. Shahidullah et S. Meon (2009). Efficiency of plant growth promoting Rhizobacteria (PGPR) for the enhancement of rice growth. *Afri. J. Biotechnol.*, 8 : 1247-1252.

-Costacurta, A., et J. Vanderleyden (1995). Synthesis of phytohormones by plant-associated bacteria. *Crit. Rev. Microbiol.* 21:1–18.

Egamberdieva D, Kucharova Z (2009). Selection for root colonizing bacteria stimulating wheat growth in saline soils. *Boil. Fert. Soil.* 45 :563–571

Fernando W.G.D., Ramarathnam R., Akkanas-Krishnamoorthy S.& Savchuk S.C., 2005. Identification and use of potential bacterial organic antifungal volatiles in biocontrol. *Soil Biol. Biochem.* 37: 955–964.

Finkelstein, R. R., Gampala, S. S., Rock, C. D. (2002). Abscisic acid signaling in seeds and seedlings. *The Plant Cell*, 14(suppl 1), S15-S45.

-Gyaneshwar, P., GN. Kumar, LJ. Parekh, PS. Poole (2002). Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. *Plant Soil.* 245(1):83-93.

Haas, D., Défago, G. (2005). Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nature Reviews Microbiology*, 3(4), 307-319.

Hoft.M et Vos.P (2006). Plant pathogenic *Pseudomonas* species. Dans *Plant Association Bacteria PART 3*. Springer, Pays-Bas. 507-533.

- Jain D. K. and Patriaui D. G (1985).** Characterization of a substance produced by *Azospirillum* which causes branching of wheat root hairs. *Canadian Journal of microbiology* 31: 206-210
- Linda S. Thomashow, David M. Weller, Robert F. Bonsall, and Leland S. Pierson,1990.** Production of the Antibiotic Phenazine-1-Carboxylic Acid by Fluorescent *Pseudomonas* Species in the Rhizosphere of Wheat. U.S. Department of Agriculture, Washington State University. 56(4)pp 908–912.
- Long S.R (2001).** Genes and signals in the *Rhizobium*-legume symbiosis. *Plant growth and physical.*125: 69-72.
- Loper S.R et Gross H (2007).** Genomic analysis of antifungal metabolite production by *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *Eur.J. Plant Pathol.* 119: 265-278.
- Nautiyal, C. S. (1999).** An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS microbiology Letters*, 170(1), 265-270.
- Oldroyd, GE., EM. Engstrom, SR. Long (2001).** Ethylene inhibits the Nod factor signal transduction pathway of *Medicago truncatula*. *Plant cell.*13:1835–1849.
- Perez-Alfocea, F., Albacete, A., Ghanem, M. E., Dodd, I. C. (2010).** Hormonal regulation of source–sink relations to maintain crop productivity under salinity: a case study of root-to-shoot signalling in tomato. *Functional Plant Biology*, 37(7), 592-603.
- Podile, AR. et GK. Kishore (2006).** Plant growth-promoting rhizobacteria. In: Gnanamanickam SS (ed) *Plant-associated bacteria: rhizosphere bacteria*. Springer, Netherlands, pp 195–230.
- Reyes, I., L. Alvarez, H. El-Ayoubiet A. Valery (2008).** Selection and evaluation of growth promoting rhizobacteria on pepper and maize. *Bioagro.*20:37–48.

Annexes

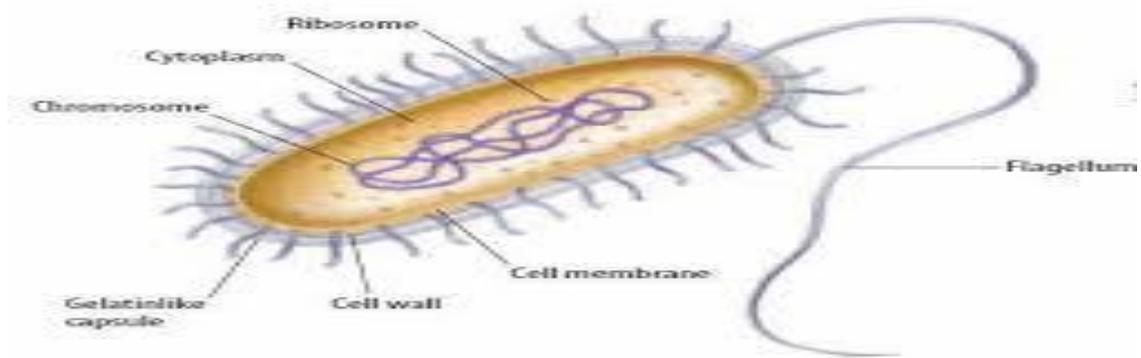
Annexe

Préparation des dilutions :

Une série de dilution de 10^{-1} à 10^{-9} a été effectuée de la manière suivante :

D'une façon aseptique on prélève 1 ml de la solution mère préalablement préparée et homogénéisée qu'on introduit dans un tube de 9 ml d'eau physiologique ce qui nous donne la dilution 10^{-1} , de cette manière on prélève 1 ml que nous introduisant dans autre tube de 9 ml d'eau physiologique pour obtenir une dilution de 10^{-2} , et on opère de la même façon pour les autres dilutions

les composant de *Pseudomonas aeruginosa* :



Appareillage

Microscpe



Etuve d'incubation



Spectro photometer





Agitateur magnétique
chouffante



Agitateur magnétique
chouffante



pipette



Balance analytique



autoclave

Résumé.

Les bactéries favorisant la croissance et contrôle des plantes dites PGPRs, ont plus en plus acquis une importance scientifique, biotechnologique et agricole. Dans ce travail, nous visons d'isoler d'identifier et de caractériser quelques souches de groupes *Pseudomonas* en tant que PGPR. Des centaines d'isolats rhizosphériques (racines des graminées), qui ressemblent au *Pseudomonas* ont été

sélectionné, cinq permis eux qui ont prouvé la production de fluorescence, ont passé aux plusieurs tests de caractérisation, Production de pyoverdine et pyocyanine, antagonisme, HCN, IAA, solubilisation de phosphate, résistance à la salinité et au cuivre...

L'isolat le plus performant suivant les tests réalisé est le OA 47.

Mots clés : *Pseudomonas*, PGPR, Pyoverdine, Pyocyanine,

Abstract

Bacteria that promote the growth and control of plants, known as PGPRs, have increasingly acquired scientific, biotechnological and agricultural importance. In this work, we aim to isolate, identify and characterize a few strains of *Pseudomonas* groups as PGPR. Thirty rhizospheric isolates (roots of grasses), which resemble *Pseudomonas* were selected, five of them which proved the production of fluorescence, passed several characterization tests: Production of pyoverdin and pyocyanin, antagonism, HCN, IAA, solubilization phosphate, resistance to salinity and copper ...

The best performing isolate according to the tests carried out is OA 47.

Keywords: *Pseudomonas*, PGPR, Pyoverdine, Pyocyanine.

ملخص

اكتسبت البكتيريا التي تعزز نمو النباتات والتحكم فيها ، والمعروفة باسم PGPRs ، أهمية علمية وتقنية حيوية وزراعية بشكل متزايد. في هذا العمل ، نهدف إلى عزل وتحديد وتوصيف بعض سلالات مجموعات *Pseudomonas* على أنها PGPR. تم اختيار ثلاثين عزلة جذرية (جذور الحشائش) تشبه الزوائف ، خمسة منها أثبتت إنتاج الفلورة ، اجتازت عدة اختبارات توصيف ، إنتاج البيوفيرين والبيوسيانين ، العداء ، HCN ، IAA ، الذوبان الفوسفات ، مقاومة الملوحة والنحاس .

العزلة الأفضل أداءً وفقاً للاختبارات التي تم إجراؤها هي OA 47.

الكلمات الرئيسية: *Pseudomonas* ، PGPR ، Pyoverdine ، Pyocyanine ،